Untersuchungen zur Primärstruktur eines Insektenhämoglobins (Chironomus thummi thummi, Komponente IV)

Helga Plagens

1975

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München/Martinsried

Untersuchungen zur Primärstruktur eines Insektenhämoglobins (Chironomus thummi thummi, Komponente IV)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von

Helga Plagens, geb. Mussnig
aus Minden

1975

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G.Braunitzer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F.Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut in München und Martinsried unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer durchgeführt.

Herrn Prof. Braunitzer danke ich sehr herzlich für zahlreiche Diskussionen und Ratschläge.

Fräulein B. Schrank und A. Ruhfus bin ich für die Ausführung der automatischen Sequenzanalyse zu besonderem Dank verbunden sowie Herrn A. Stangl für die Ausführung der Analysen.

Abkürzungen

AS	Aminosäuren
A-H	Helicale Bereiche des Hämoglobins oder Myoglobins
A11	11. Aminosäurerest der A-Helix
BrCN	Bromcyan
BrCN 1	durch Spaltung mit Bromcyan erhaltenes Peptid (N-terminal)
CTT	Chironomus thummi thummi
CTT-IV	Hämoglobin IV der Larven von CTT
Dansyl-	1.5-Dimethylamino-naphtalin-sulfonyl-
DEAE-Cellulose	Diäthylaminoäthyl-Cellulose
M	molar
QAE-	Diäthyl-(2-hydroxypropyl)aminoäthyl-
SP-	Sulfopropyl-
T	tryptisches Peptid
T1, T2 ...	Folge der tryptischen Peptide

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Einleitung		1
	Allgemeiner Teil	
1.	Das Hämoglobin IV von Chironomus thummi thummi (CTT-IV)	4
	1.1. Isolierung und Charakterisierung	4
2.	Bromcyanspaltung von CTT-IV	7
	2.1. Umsetzung mit Bromcyan	8
	2.2. Isolierung der Fragmente	9
3.	"Löslicher" tryptischer Anteil	13
	3.1. Spaltung mit Trypsin	13
	3.2. Chromatographische Trennungen	15
4.	"Unlöslicher" Anteil	24
	4.1. Allgemeine Betrachtung	24
	4.2. Chromatographische Trennung der "Core"-Peptide	26
5.	"Argininspaltung"nach chemischer Modifizierung der Lysinreste	31
	5.1. Blockierungsreaktion mit Maleinsäureanhydrid	31
	5.2. Blockierungsreaktion mit 5-(Isothiocyanato)benzol-1.3.disulfonsäure (Substanz II)	34
6.	Automatische Sequenzanalyse	41
	6.1. Vorbehandlung der tryptischen Lysylpeptide	42
7.	Diskussion	45

Seite

Experimenteller Teil

1. Isolierung und Charakterisierung von CTT-IV 56
   1.1. Monomeren-Dimeren Trennung 56
   1.2. Chromatographie der Monomeren-Fraktion 56
   1.3. Analytische diskontinuierliche Elektrophorese 57
2. Spaltung mit Trypsin 58
3. Chemische Reaktionen an CTT-IV 59
   3.1. Bromcyanspaltung 59
   3.2. Blockierung der Lysinreste 59
      3.2.1. Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid 59
      3.2.2. Umsetzung mit 5-(Isothiocyanato)benzol-1.3.disulfonsäure, Dinatriumsalz (Substanz II) 60
4. Reinigung der Peptide 60
   4.1. Allgemeines 60
   4.2. Gelfiltration über Sephadex 61
   4.3. Austauscherchromatographie 62
      4.3.1. Chromatographie über Kationenaustauscher 62
      4.3.2. Chromatographie über Anionenaustauscher 63
5. Sequenzermittlung 64
   5.1. Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid 64
   5.2. Automatische Sequenzbestimmung 65

Zusammenfassung 67

Literaturverzeichnis 69

Einleitung

Die Reihenfolge der kovalent gebundenen Aminosäuren eines Proteins enthält allein die Information für seine Struktur. Diese wiederum bestimmt die Funktion des Eiweißstoffes. So sind einige Enzyme bekannt, die bei reversibler Denaturierung nach völliger Entfaltung die ursprüngliche Tertiärstruktur rückbilden und ihre Enzymaktivität fast vollständig wiedergewinnen (1). Entsprechend den z.T. sehr ähnlichen Eigenschaften der Aminosäuren ist jedoch die in der Sequenz niedergelegte Information redundant: Im Fall des Pottwal-Myoglobins und eines Insektenhämoglobins sind bei fast identischer Tertiarstruktur mehr als 80% der Sequenz verschieden (2,3,38). Die Redundanz der Information und die Vielfalt an Wechselwirkungen zwischen räumlich benachbarten Gruppen und Teilbereichen eines Proteinmoleküls haben bisher bei bekannter Sequenz die theoretische Voraussage der Sekundär- und Tertiärstruktur nicht ermöglicht. Eine der notwendigen Voraussetzungen für Untersuchungen dieser Art ist die Analyse von Konformationsvarianten, die sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden, speziell solcher, die monomer vorliegen, um die Komplexität möglicher Wechselwirkungen auf ein Minimum zu beschränken. Die monomeren larvalen Hämoglobine der Gattung Chironomus scheinen für diesen Zweck besonders geeignet, weil mit etwa 10 - 15 verschiedenen Hämoglobinen in einer Art der ausgeprägteste, bisher nachgewiesene Proteinpolymorphismus vorliegt (39, 4,5,6).

Die Chironomiden gehören zu den wenigen Invertebraten, bei denen niedermolekulare Hämoglobine gefunden werden (7). Man könnte sagen, sie befinden sich in einem "Experimentierstadium", da gleichzeitig Monomere und Dimere

(9,5,8) oder bei anderen Arten zusätzlich auch Tetramere nachgewiesen wurden (6). Die Sequenzunterschiede der Hämoglobinkomponenten innerhalb einer Art entsprechen den unterschiedlichsten phylogenetischen Distanzen. Bemerkenswert ist das Auftreten von phylogenetisch jungen, sogenannten "Zwillingskomponenten" in vier Arten aus drei Kontinenten (6), welches nur mit der Abstammung dieser Species von einem gemeinsamen Vorgänger erklärt werden kann. Die Zwillingskomponenten weisen in ihren Primärstrukturen schätzungsweise zwischen 2 und etwa 20 Aminosäureaustausche auf (6). Bei der europäischen Art Chironomus th. th. besteht dieser nahe Verwandtschaftsgrad (etwa 20 Austausche) zwischen dem in seiner Primärstruktur (2) bekannten CTT-III und dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten CTT-IV. Insbesondere diese nahe verwandten Proteine erfüllen die oben erwähnten Bedingungen der abgestuften Variabilität, und es ist daher von größtem Interesse, Verfahren zur Aufklärung ihrer Primärstrukturen möglichst zeitsparend und rationell auszuarbeiten.

Die Entwicklung des Sequenators (10) hat die Strategie vollständig geändert. So waren bspw. bei der Sequenzanalyse des 316 Aminosäurereste langen Thermolysins, bei der der Sequenator nur teilweise eingesetzt wurde, 173 Fragmente erforderlich (11). Dagegen gelang ein Jahr nach Bekanntwerden der ersten vollautomatisch ermittelten Sequenz eines Proteins (ß-Lactoglobulin) (41) die Bestimmung der Primärstruktur des Trypsins vom Schwein (223 AS) mit nur neun passend gewählten Fragmenten (12). Diese wurden unter einer größeren Anzahl aus mehreren Spaltungen erhaltener Peptide zur Sequenzanalyse ausgesucht. Nur die Folge von 2 Aminosäuren konnte nicht festgelegt werden. Es ist zu erwähnen, daß hier die zu 82 % homologe Sequenz des Trypsins vom Rind bekannt war.

Die Probleme bei der Sequenzbestimmung der meisten Hämoglobine lagen bisher fast ausschließlich in der Isolierung der

tryptischen Peptide des "Cores" (G-H-Helix), das den hydrophoben C-terminalen Bereich bildet. Es schien daher zweckmäßig, am Beispiel des monomeren Hämoglobins IV von den in der Literatur (13) beschriebenen spezifischen Modifizierungsreaktionen von Aminosäuren, die selektive Spaltungen der Polypeptidkette ermöglichen, diejenigen auszuwählen, welche zur Isolierung "sequenatorgerechter" Peptide des "Core"-Bereichs führen.

Von CTT-IV war außer der Bruttozusammensetzung die N- und C-terminale Aminosäure bekannt (5). In der vorliegenden Arbeit wurden neben den tryptischen Peptiden die durch Spaltung von CTT-IV mit BrCN erhaltenen Bruchstücke isoliert. Wie sich zeigte, ist das Bromcyanpeptid des "Core"-Bereichs im Sequenator nicht verwendbar. Zur Gewinnung anderer "Core"-Peptide wurde daher außer der tryptischen Spaltung unter veränderten Bedingungen die Umsetzung der Lysinreste mit verschiedenen Blockierungsmitteln durchgeführt und die Isolierung der resultierenden Peptide vorgenommen. Zwei Peptide konnten im Sequenator nicht abgebaut werden, weshalb in dieser Arbeit die Sequenz von CTT-IV mit Ausnahme der Positionen 77-90 und 121-134 vorgelegt wird. Während gegenüber CTT-III nur 15% der Aminosäuren ausgetauscht sind, besitzt CTT-IV einen etwa doppelt so großen Bohreffekt (36). Da die für den Bohreffekt bei CTT-III wesentlichen Bereiche der CTT-IV - Sequenz vorliegen, wurde versucht, diese Unterschiede molekular zu deuten.

Allgemeiner Teil

1. Das Hämoglobin IV von Chironomus thummi thummi (CTT-IV)

1.1. Isolierung und Charakterisierung

Die in der Literatur eingeführte Bezeichnung für die Hämoglobine von Chironomus thummi thummi bezieht sich auf die Reihenfolge, in der die Komponenten des Hämoglobin-Rohextraktes von DEAE-Cellulose eluiert werden (5). Es erwies sich als vorteilhaft, der Ionenaustauscherchromatographie eine Gelfiltration über Sephadex G-75 voranzustellen und anschließend die erhaltenen Fraktionen aus Monomeren bzw. Dimeren getrennt zu verarbeiten. Die bisher isolierten monomeren Komponenten werden als I, IA, IB (44), IIIA, III und IV bezeichnet (6).

Zur Gewinnung von CTT-IV wurden mehrere Monomeren-Dimeren Trennungen durchgeführt (s. Exper. Teil). Aus 28 g lyophilisiertem, von Fremdproteinen gereinigtem Hämoglobingemisch konnten 5,5 g Monomere und 12,3 g Dimere gewonnen werden. Das Gemisch der monomeren Hämoglobine wurde durch Chromatographie an DEAE-Cellulose weiter fraktioniert. CTT-IV erwies sich als elektrophoretisch einheitlich. Als N-terminale Aminosäure wurde Leucin nachgewiesen (5).

Bei der Analyse des tryptischen Hydrolysates (40) wurde als frei vorliegende Aminosäure Methionin gefunden. Die C-terminale Sequenz Lys-Met oder Arg-Met war daher wahrscheinlich. Braun et al. hatten als C-terminale Aminosäure durch Hydrazinolyse Methionin identifiziert. (5)

Von CTT-IV wurden nach Hydrolyse mit 6n HCl und 4n Methansulfonsäure in Anwesenheit von 0,2% 3-(2-amino-äthyl-) indol (18) Analysen durchgeführt und folgendes Ergebnis erhalten (Tab. 1):

Tab. 1: Analyse von CTT-IV nach Hydrolyse mit 4n Methansulfonsäure (18), berechnet auf 136 Aminosäuren

(X) = nach Sequenzanalyse geforderte Anzahl von Aminosäuren

	4 n Methansulfonsäure 125°C (20h)	(X)
Lys	9,37	9
His	3,74	4
Arg	1,87	2
Asp	16,27	16
Thr	8,67	9
Ser	10,30	10
Glu	6,32	6
Pro	3,01	3
Gly	13,01	13
Ala	20,00	20
Val	9,10	10
Met	2,41	3
Ile	6,99	8
Leu	5,60	6
Tyr	1,56	2
Phe	14,22	14
Try	0,60	1

Bei der Hydrolyse mit 4n Methansulfonsäure sollen Ile-Ile- und Ile-Val-Bindungen bei einer Temperatur von 125°C bereits nach 20 h vollständig gespalten sein (18), während sie mit 6n HCl nur langsam hydrolysieren. Wie der Tab. 1 zu entnehmen ist, lagen die Werte für Isoleucin und Valin, verglichen mit den theoretischen, noch zu niedrig.

Nach Oxidation mit Perameisensäure und anschließender saurer Hydrolyse konnte keine Cysteinsäure nachgewiesen werden.

Unter den gebräuchlichen Bedingungen der sauren Hydrolyse mit 6n HCl wird Tryptophan zerstört. Führt man die Hydrolyse mit 6n Salzsäure nach Matsubara (19) in Anwesenheit von 6% Thioglykolsäure durch, so kann das Tryptophan auf der 15 cm Säule des Analysators nachgewiesen werden. Für CTT-IV wurde mit dieser Methode ein Wert von 0,58 gefunden.

Die oben erwähnte Hydrolysenmethode mit 4n Methansulfonsäure nach Liu (18), ausgeführt bei 115°C, 24 h, ergab einen Tryptophanwert von 0,6 (s. Tab. 1).

Von den in der Literatur beschriebenen selektiven Spaltungen ist diejenige mit Bromcyan (20,21) von großer Spezifität. Die weitere Charakterisierung von CTT-IV erfolgte daher durch die Peptide der Bromcyanspaltung.

2. Bromcyanspaltung von CTT-IV

Bei der Spaltung mit Bromcyan nach Gross und Witkop (20,21) wird der Methioninrest über mehrere Zwischenstufen in das Homoserinlacton überführt und das Protein oder Peptid am C-terminalen Ende dieser Aminosäure gespalten.

Wie aus der Bruttoformel hervorgeht, sind in CTT-IV drei Methioninreste enthalten. Da bekannt war, daß ein Methioninrest den C-Terminus der Polypeptidkette bildet, verblieben zwei für "interne" Spaltung.

2.1. Umsetzung mit Bromcyan

Die Spaltung mit Bromcyan wurde in 70% iger Ameisensäure (21) am Hämoglobin durchgeführt (s. Exper. Teil). Um den Verlauf der Bromcyanspaltung qualitativ beurteilen zu können, wurden Endgruppen nach der Dansylmethode (17) und ein Fingerprint (22) angefertigt (s. Abb. 1). Wie sich durch weitere Analysen herausstellte, trat das BrCN 3 (vgl. Tab. 2) als Homoserin- und Homoserinlactonderivat auf. Nebenflecke, die aufgrund nicht quantitativer oder unspezifischer Spaltung hervorgerufen würden, konnten nicht beobachtet werden.

Außer Leucin wurden als neue Endgruppen Lysin und Valin nachgewiesen.

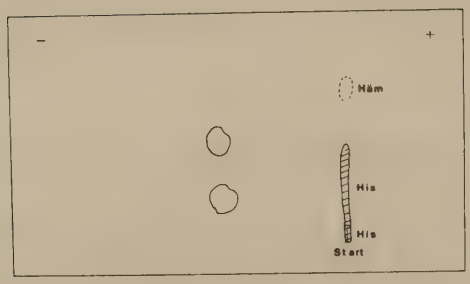


Abb. 1: Fingerprint von CTT-IV nach Bromcyanspaltung
Material: 0,15 μ Mol (2,5 mg)
Elektrophoresebedingungen: 2,5 kV, 60-70 mA, 3 h. Papierchromatographie im System: Pyridin : Eisessig : n-Butanol : Wasser = 30 : 10 : 30 : 30, 26 h, aufsteigend.

2.2. Isolierung der Fragmente

Für einen analytischen Vorversuch wurden 0,3 μ Mol (1/10 des Volumens) entnommen und auf einer Sephadex G-50 Säule fraktioniert.

Durch Anfertigung einer Dünnschichtchromatographie wurden die einzelnen Gipfel auf Einheitlichkeit untersucht, der Tryptophangehalt der zweiten Fraktion wurde durch Farbtest und Spektrum bestätigt. Dieselben Versuchsbedingungen konnten für den präparativen Lauf mit der 9-fachen Menge übernommen werden. Die Abb. 2 zeigt die Trennung der Bromcyanpeptide (2,5 μ Mol) über Sephadex G-50 f. Das Elutionsdiagramm stimmte gut mit dem analytischen Versuch überein.

Wie aus dem Chromatogramm (Abb. 3) hervorgeht, waren die Peptide der - wie in Abb. 2 angegeben - jeweils vereinigten Fraktionen I und II einheitlich (BrCN 1 und BrCN 2). BrCN 3 war in der Schulter des Gipfels III enthalten, während die UV-Absorption der übrigen Fraktionen durch Hämprodukte hervorgerufen wurde. BrCN 3 trat in der Homoserin- und Homoserinlactonform auf (s. Fingerprint, Abb. 1). Auch bei der weiteren Reinigung über SP-Sephadex wurden unter den angewendeten Chromatographiebedingungen beide Formen isoliert und ergaben identische Aminosäureanalysen.

In der Tabelle 2 sind die Analysen der Peptide wiedergegeben. BrCN 1 nimmt, vom N-Terminus der Polypeptidkette gezählt, Position 1-108 ein, BrCN 2 (23 Aminosäuren) Position 109-131 und BrCN 3 (5 Aminosäuren) bildet mit Position 132-136 das Carboxylende.

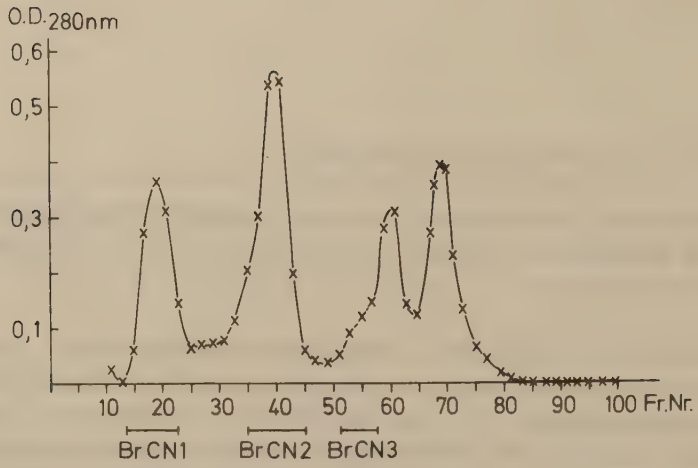


Abb. 2: Trennung der Bromcyanpeptide
Material: 2,6 μ Mol, Säule: 150 x 2 cm, Sephadex G-50 f,
Elutionsmittel: 50%ige Essigsäure, Elutionsgeschwindigkeit: 3 ml/30 min, Fraktionen: 3 ml. Extinktion gemessen bei 280 nm.

Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm nach Trennung der Bromcyanpeptide über Sephadex. Chromatographie im System: Pyridin: Eisessig: n-Butanol: Wasser = 30 : 10 : 30 : 30
Rf = Aminosäurenreferenz

Tab. 2: Analysen der Bromcyanpeptide 1, 2 und 3.
1) Met bzw. Homoserin-Homoserinlacton
(X) = nach Sequenzanalyse geforderte Anzahl von Aminosäuren

	BrCN 1	(X)	BrCN 2	BrCN 3		CTT-IV	(X)
Lys	6,76	(7)	1,09	1,00	9	9,37	(9)
His	3,14	(3)	0,95		4	3,74	(4)
Arg	2,09	(2)			2	1,87	(2)
Asp	13,99	(14)	2,28		16	16,27	(16)
Thr	6,88	(7)	2,05		9	8,67	(9)
Ser	9,86	(10)			10	10,30	(10)
Glu	5,33	(5)	1,14		6	6,32	(6)
Pro	3,06	(3)			3	3,01	(3)
Gly	10,06	(10)	3,11		13	13,01	(13)
Ala	12,88	(12)	6,72	1,05	21	20,00	(20)
Val	8,05	(9)		0,97	9	9,10	(10)
Met[1)]	1,00	(1)	0,75	0,65	3	2,41	(3)
Ile	6,00	(8)			6	6,99	(8)
Leu	5,14	(5)	1,19		6	5,60	(6)
Tyr	1,85	(2)			2	1,56	(2)
Phe	9,85	(10)	3,05	0,97	14	14,22	(14)
Try	-		+	-	+	0,60	(1)
	106 AS	(108 AS)	23 AS	5 AS	134 AS	134 AS	(136 AS)

Durch die Spaltung der Polypeptidkette mit Bromcyan und Isolierung der Peptide konnte vor allem die Bruttoformel gesichert und durch BrCN 2 die Aminosäurezusammensetzung des C-terminalen Bereichs festgelegt werden. Die Sequenzanalyse wurde an keinem dieser Peptide ausgeführt, da die Sequenzermittlung an BrCN 1 nicht mehr Information liefert als der Abbau am ungespaltenen Protein. Wie sich herausstellte, bildet das einzige Lysin des BrCN 2 den N-Terminus dieses Peptids. Eine ε-Markierung der Aminogruppe des Lysins mit sauren Senfölen nach Braunitzer (23,24) war daher für BrCN 2 nicht möglich. Die Sequenzanalyse des nicht modifizierten Peptids nach dem Originalverfahren aber schien nicht lohnend.

3. "Löslicher" tryptischer Anteil

3.1. Spaltung mit Trypsin

Das Hämoglobin CTT-IV enthält 9 Lysin- und 2 Argininreste. Es waren also 12 Peptide zu erwarten.

Die Spaltung des Globins wurde in 0,5% iger Ammoniumbicarbonatlösung pH 8,5 durchgeführt. Das Häm war zuvor nach Rossi-Fanelli (25) abgespalten worden. Zur Isolierung des "Core"-Peptides I (Position 91-135) erwies sich später ein Abweichen von diesen Standardbedingungen als zweckmäßig (s. Kap. "Unlöslicher" Anteil). Bei obigen Bedingungen wurde eine unspezifische Spaltung nach beiden Tyrosinresten beobachtet.

Die Spaltung wurde durch Ansäuern mit Essigsäure beendet und die schwerlöslichen Peptide isoelektrisch gefällt. Für ihre Reinigung erwies es sich jedoch als günstiger, das fast vollständig gelöste tryptische Hydrolysat von dem geringen, bei pH 8,5 ungelösten Rückstand durch Zentrifugation zu trennen und den Überstand sofort zu lyophilisieren.

Zur Beurteilung der Spaltungen wurden Fingerprints angefertigt. In Abb. 4 ist die Komponente CTT-IV dargestellt.

Um festzustellen, ob Lys-Lys- oder Lys-Arg-Bindungen innerhalb des Proteins vorliegen, wurde ein Aliquot des Hydrolysats analysiert (40). Als frei vorliegende Aminosäure wurde nur Methionin gefunden, das bereits als C-Terminus bekannt war.

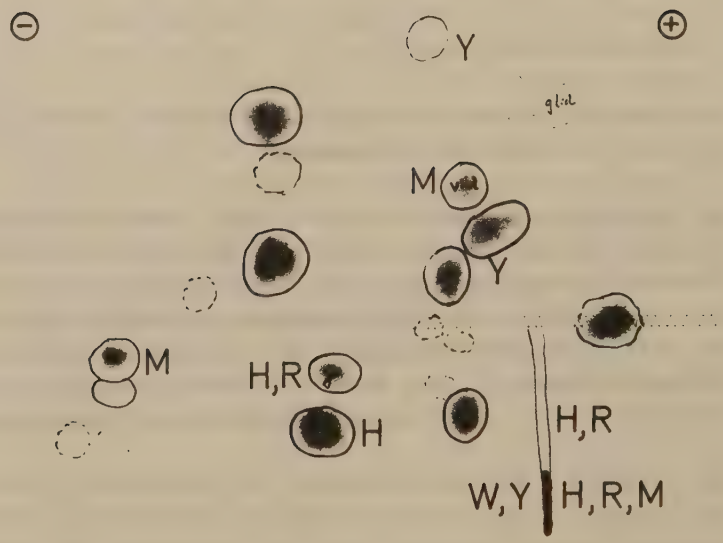


Abb. 4: Fingerprint des tryptischen Hydrolysates von CTT-IV, nach Reaktion mit Ninhydrin. Elektrophorese: Pyridin-Acetat-Puffer pH 5,4, 2,5 kV, 60-65 mA, 3h. Papierchromatographie im System: n-Butanol: Pyridin:Eisessig:Wasser = 30:30:10:30.
Mit spezifischen Reagenzien nachgewiesene Aminosäurereste wurden wie folgt gekennzeichnet: R=Arginin, H=Histidin, M=Methionin, Y=Tyrosin, W=Tryptophan

3.2. Chromatographische Trennungen

Die Auftrennung der "löslichen" Peptide des tryptischen Hydrolysats wurde durch Gelfiltration und weitere Fraktionierung über Ionenaustauscher erreicht.

Wie erwähnt, wurde die erste Spaltung (Ansatz: 27 μ Mol) durch Ansäuern mit Essigsäure beendet. Ein großer Teil der ausgefällten, schwerlöslichen Peptide war nach dem Lyophilisieren in keinem der üblichen Systeme befriedigend zu lösen, so daß eine getrennte Behandlung des löslichen und "unlöslichen" Anteils erforderlich war. Die löslichen Peptide wurden über Sephadex G-50 f mit 6 M Essigsäure in zehn Fraktionen getrennt, die anschließend durch Papierchromatographie untersucht wurden. Durch Farbtests konnten einige Spaltstücke näher charakterisiert werden.

Für weitere Auftrennungen wurden Phosphorcellulose, Dowex 1x2, Dowex 50x4 und QAE-Sephadex verwendet. Einige dieser Chromatographien wurden mit dem Präparativzusatz zum Aminosäureanalysator der Fa. Beckman ausgeführt. Durch Abzweigung eines Aliquots des Eluats war die Aufzeichnung des Elutionsprofils möglich (Abb. 5).

Unter Verwendung der genannten Austauscher konnten die löslichen Peptide (außer T3) isoliert werden. Von T7 und T10 (Fragment aus dem "Core"-Bereich) konnten jedoch nur 0,3 μ Mol bzw. 0,2 μ Mol gewonnen werden. Unter den angewandten Versuchsbedingungen war T7 meist mit T10 oder T4 verunreinigt. Die übrigen Peptide waren nach der Reinigung in ausreichender Menge für die Sequenzanalyse vorhanden.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurde der Schwerpunkt auf die Isolierung der "Core"-Peptide (Kap. 4) und die in zu geringer Ausbeute erhaltenen Spaltstücke T7 und T10 gelegt. (Die Aminosäurezusammensetzung von T3 war bereits durch den Abbau des Proteins im Sequenator bekannt, T3a (Pos. 18-25) konnte jedoch später nach Chromatographie über SP-Sephadex isoliert werden.)

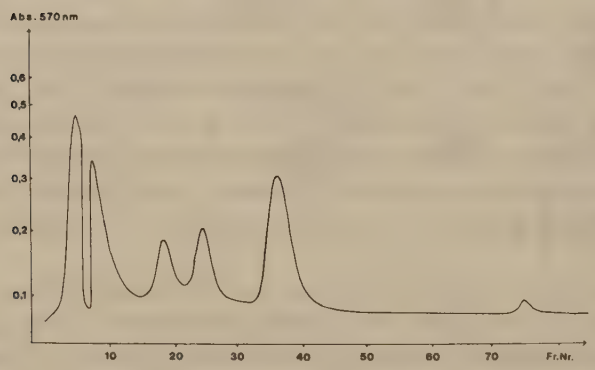


Abb. 5: Chromatographie tryptischer Peptide an QAE-Sephadex unter Verwendung des Peptidators der Fa. Beckman. Material: Fraktion nach Gelfiltration über Sephadex G-50 f in 6 M Essigsäure, Säule: 0,9 x 16 cm, Säulentemperatur: 40°C. Äquilibrierpuffer: 0,01 M pH 8,5, 1. Gradient ab Fr.5: 0,25 M pH 6,3,2. Gradient ab Fr.55: 2,5 M pH 4,8.

Da nach Ausfällung des schwerlöslichen Anteils mit Essigsäure die "Core"-Peptide nicht mehr zu lösen waren, wurde in einer weiteren Methode versucht, das gesamte tryptische Hydrolysat zu fraktionieren.

Als geeignetes Lösungsmittel für die Gelfiltration erwies sich verdünnte Propionsäure (vgl. Kap. 4).

Um Aggregationen möglichst auszuschließen, sollte eine nicht zu konzentrierte Lösung aufgetragen werden. Für einen Säulendurchmesser von 1,5 cm hatten sich 50-60 mg (3-3,5 μ Mol), gelöst in 2,2 bis 2,5 ml, als zweckmäßig erwiesen. Die Auftrennung des gespaltenen Globins über Sephadex G-75 ist der Abb. 6 zu entnehmen. In Fraktion I und II waren Tryptophanpeptide enthalten (s. Abb. 7). Ihre weitere Bearbeitung ist im Kap. "Unlöslicher" Anteil beschrieben.

Im Gipfel III waren T7 und T10 (je 11 AS) enthalten, während Peptide mit 8, 7 und 6 Aminosäuren im darauffolgenden eluiert wurden. Die größeren Spaltstücke T1 (19 AS) und T9 (22 AS) konnten aus II und den Zwischenfraktionen zu III isoliert werden.

Nach weiterer Fraktionierung über Sephadex G-25 in 6 molarer Essigsäure wurden T4, T7 und T10 an dem Kationenaustauscher SP-Sephadex voneinander getrennt, aus einer anderen Rechromatographie wurden T3a, T6 und T5 gewonnen und T1 und T9 konnten ebenfalls an SP-Sephadex gereinigt werden. Die in den Abb. 8a-c dargestellten Trennungen wurden mit linearen Pyridin-Formiat-Gradienten erreicht.

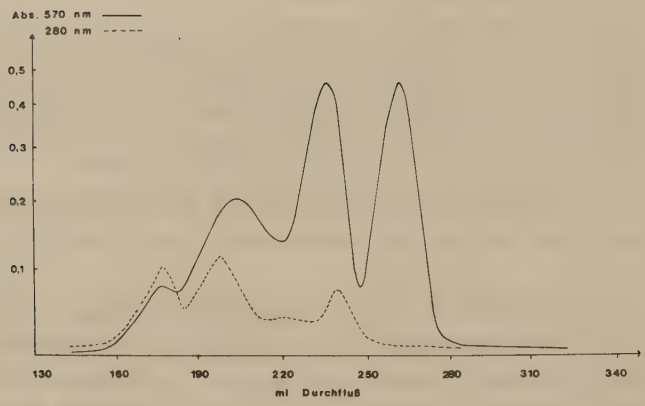


Abb. 6: Gelfiltration eines tryptischen Hydrolysates (40 mg) über Sephadex G-75 in 3 M Propionsäure. Fraktionen: 3,1 ml / 30 min, Säule: 1,5 x 170 cm. Absorption gemessen bei 280 nm und 570 nm (Ninhydrinfärbung, alkalische Hydrolyse)

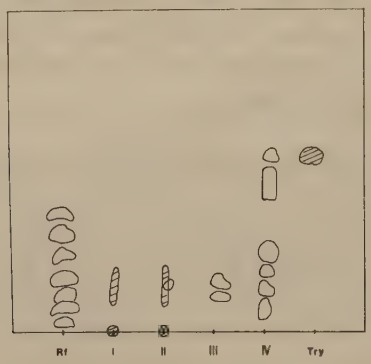
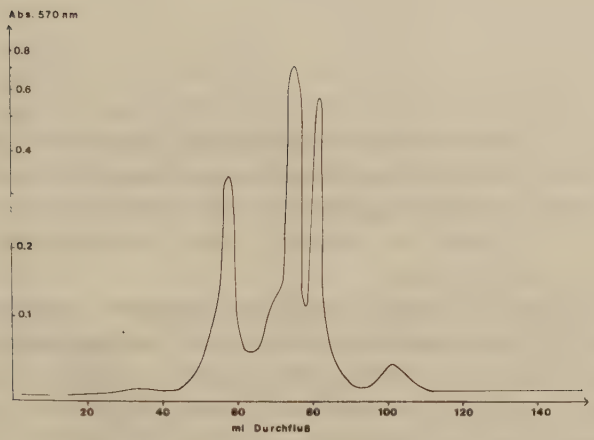
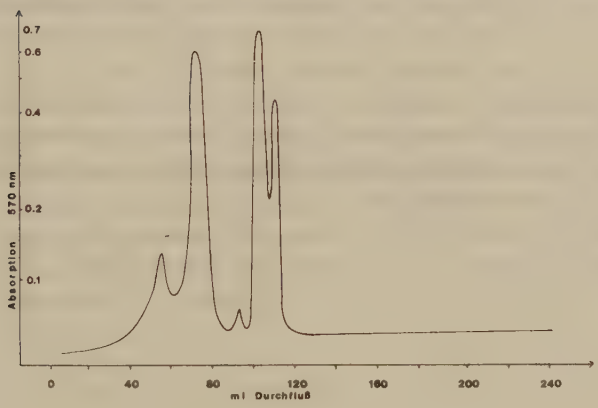


Abb. 7: Übersichtschromatogramm zu Abb. 6. (System: n-Butanol: Eisessig:Wasser = 4:1:5)

8a


Abs. 570 nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0.1
20
40
60
80
100
120
140
ml Durchfluß

8b


Absorption 570 nm
0.7
0.6
0.4
0.2
0.1
0
40
80
120
160
200
240
ml Durchfluß

8c

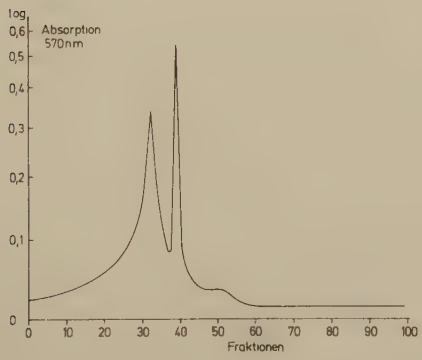

log
Absorption
570nm
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Fraktionen

Abb. 8a-c: Chromatographien an SP-Sephadex C-25, Material: durch Gelfiltration mit 3 M Propionsäure vorgetrenntes tryptisches Hydrolysat, Äquilibrierpuffer: 0,1 M Pyridin-Formiat pH 3,0, Säulentemperatur 40°C. Aliquot 100µl.

a: aufgetragen: 4,8 mg, linearer Gradient von 0,1 M pH 3,0 bis 2,0 M pH 6,1 Pyridin-Formiat, Puffergefäße je 100 ml, Fraktionen: 2,0 ml, Säule: 0,9 x 36 cm.

b: aufgetragen: 5,5 mg, linearer Gradient von 0,1 M pH 3,0 bis 2,0 M pH 4,4, ab Fr. 127 2,0 m pH 6,1 Pyridin-Formiat, Puffergefäße je 190 ml, Säule: 0,9 x 38 cm.

c: aufgetragen: 5,4 mg, Puffer wie in 8a angegeben, Puffergefäße je 190 ml, Säule: 0,9 x 40 cm.

In Tab. 3 sind die Aminosäureanalysen der isolierten Peptide wiedergegeben, in Tab. 4 sind die abgerundeten Molverhältnisse den entsprechenden Werten von CTT-III gegenübergestellt.

T 1 (CTT-IV) umfaßt aufgrund eines Lys --- Gly-Austausches die Peptide T 1 und T 2 der Komponente III und wurde "T 1 + T 2" genannt. Die Bruttoformeln der in CTT-III und CTT-IV homologen Spaltstücke T 7 (Pos. 51-61) weichen relativ am stärksten voneinander ab. Die nach Analysen geforderte Mindestzahl ausgetauschter Aminosäuren beträgt 5 von 11. (Tatsächlich liegen 6 Sequenzunterschiede vor).

Der N-Terminus von T 10 (Pos. 91) bildet den Anfang des "Core"-Bereiches, doch konnte T 10 wie T 11, durch partielle Spaltung des "Cores" entstanden, aus dem "löslichen" Anteil isoliert werden. T 4 enthält kein Methionin wie das entsprechende Fragment von CTT-III, so daß Unterschiede zwischen CTT-III und CTT-IV in Größe und Zahl der Bromcyanpeptide bestehen.

Peptid	T1+T2		T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T11-T13[1]	T13	Br.Anal.(Theor.) CTT-IV		
Pos.	1-17		-29	-37	-44	-50	-61	-68	-90	-101	-109	102-136	136			
AS																
Lys	1,10		1	1,04	1,02	0,92	1,15	1,00			0,91	1,29		8-9	9,37	(9)
His							0,81		1,00	0,79		1,10		4	3,74	(4)
Arg									1,05	0.93		0.09		2	1,87	(2)
Asp	1,20	1,32		0.98		2,06	1,96		4,11	3,23		3,22		17	16,27	(16)
Thr	1,98				0,90				2,75	0,97		2,02		9	8,67	(9)
Ser	2,91			1,10		1,05	2,10	1,10	1,18		1,08	1,47		10	10,30	(10)
Glu	2,13			0,81	0,93					0,96		1,19		6	6,32	(6)
Pro				1,04					1,90					3	3,01	(3)
Gly	0,98	1,76			1,07		1,15	0,95	1,98	1,12	1,05	3,87		13	13,01	(13)
Ala	1,81	1,02	1	1,97	1,05		2,78		1,07		1,04	6,45		17-18	20,00	(20)
Val	1,91	1,00	1					0,45[2]	1,89 (1,87)*	0,98	1,00	2,39		9-10	9,10	(10)
Met											0,83	1,29	1	2-3	2,41	(3)
Ile	0,98	0,99		1,04		0,95		0,38[2]	1,68[3] (2,54)*			0,73		6-7	6,99	(8)
Leu	1,05	0,98				0,99			1,10 (1,07)*	0,98		1,38		6	5,60	(6)
Tyr		0,81									0,93	0,73		2	1,56	(2)
Phe	1,02		1		2,00		1,01	1,91	0,97 (0,93)	1,00	1,13	4,70		14	14,22	(14)
Try												+		+	0,60	(1)
AS	17	8	4	8	7	6	11	7	22	11	8	32	1	133	134	136 AS

Tab. 3: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide von CTT-IV. Hydrolyse: 20 h mit 6n HCl, *300 h.

1) Das Peptid T11-T13 wurde nach Blockierung mit Substanz II (s. Kap. 5.2.) und anschließender Spaltung mit Trypsin erhalten.
2) Ile-Val-Bindung!
3) Nach Sequenzanalyse sind drei Isoleucinreste vorhanden.

Peptid	T1+T2		T3		T4		T5		T6		T7		T8		T9		T10		T11		T13	
CTT-A S	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV	III	IV
Lys	2	1	4	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	-	-	1	1		
His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-		
Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-		
Asp	2	1	1	1	1	1	-	-	1	2	1	2	-	-	3	4	3	3	-	-		
Thr	1	2	-	-	-	-	1	1	-	-	2°	-	-	-	1	3	1	1	-	-		
Ser	3	3	-	-	1	1	-	-	1	1	-	2	1	1	1	1	-	-	1	1		
Glu	2	2	-	-	-	1	1	1	1	-	1	-	-	-	2	-	1	1				
Pro	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	-	-	-	2	2	-	-	-	-		
Gly	-	1	2	2	-	-	1	1	-	-	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1		
Ala	2	2	1	2	2	2	1	1	-	-	2	3	-	-	2	1	o	1	1	1		
Val	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	1	1	1	1		
Met	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
Ile	1	1	1	1	1	1	-	-	1	1	o°	-	1	1	3(2-3)*		-	-	-	-		
Leu	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-		
Tyr	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1		
Phe	1	1	1	1	-	-	2	2	-	-	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1		
Try	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
n AS	17	17	12	12	8	8	7	7	6	6	11	11	7	7	22	22	11	11	8	8	1	1

Tab. 4: Gegenüberstellung der löslichen tryptischen Peptide von CTT-IV (Molverhältnisse nach Tab. 3 abgerundet) und CTT-III. o = Thr-Ile-Austausch, angegeben die Werte für die Thr-Komponente (s. Diss. S. Braig (31))

* nach Sequenzanalyse liegen drei Isoleucinreste vor.

4. "Unlöslicher" Anteil

4.1. Allgemeine Betrachtung

In der Abb. 9 ist schematisch die Verteilung der Lysin-, Arginin- und Methioninreste entlang der Polypeptidkette von CTT-IV dargestellt. Ihre Lage ergab sich aus der Sequenzanalyse bis Pos. 90 und für den anschließenden "Core"-Bereich wurde sie wie in CTT-III angenommen, nachdem die entsprechenden Peptide BrCN 2 und T 10 und T 11 isoliert worden waren. Später konnte diese Analogie bestätigt werden.

Durch die Struktur und die zahlreichen hydrophoben Aminosäuren wird die Polypeptidkette im "Core"-Bereich bei der enzymatischen Spaltung mit Trypsin unter bestimmten Bedingungen nicht oder nicht quantitativ hydrolysiert. Es entsteht daher ein Gemisch nahe verwandter Peptide, die über größere Bereiche gemeinsame Aminosäuresequenzen haben und daher schwierig zu trennen sind. Wegen der geringen Löslichkeit dieser Peptide können nur wenige Verfahren herangezogen werden. Durch partielle Spaltung nach Arginin Pos. 101 und Lysin Pos. 109 wurden für CTT-IV folgende überlappende Peptide in dem tryptischen Hydrolysat erwartet:

1. "Core"-Peptid I (Pos. 91-135)
2. "Core"-Peptid II (Pos. 102-135)
3. "Core"-Peptid III (Pos. 110-135)

Beim Vorliegen aller drei "Core"-Peptide mit 45,34 und 26 Aminosäuren schien eine Trennung aussichtslos. Da aber T 10 und T 11 aus dem "Core"-Bereich in guter Ausbeute

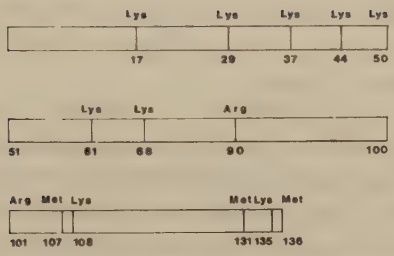


Abb. 9: Schematische Darstellung der Verteilung von Lysin-, Arginin- und Methioninresten in CTT-IV.

aus dem "löslichen" Anteil erhalten wurden, war zu vermuten, daß nur "Core"-Peptid I und III vorlagen. Es wurde daher zuerst versucht, diese aus dem tryptischen Hydrolysat zu isolieren. Sollte ihre Trennung nicht gelingen, boten sich zwei andere Lösungen an: einerseits bestand die Möglichkeit, die unterschiedliche Spaltbarkeit der Lysyl-und Arginylbindungen durch Variation der Spaltbedingungen dahingehend auszunutzen, daß nur das "Core"-Peptid I entstand. Dieses hätte durch die Nachspaltung in T 10, T 11 (s. Kap. 3) und "Core"-Peptid III zerlegt werden können.

Andererseits sollte die "Argininspaltung" nach Blockierung der Lysinreste die Isolierung des Fragmentes II gestatten. Alle drei Peptide erlauben die für die automatische Sequenzanalyse notwendige ε-Markierung nach Braunitzer (23,24), weil in Pos. 135 ein Lysin vorhanden ist. Im Gegensatz dazu ist BrCN 2, welches etwa den gleichen Bereich wie "Core"-Peptid II umfaßt, für den Abbau im Sequenator nicht verwendbar (s. Kap. 2). Im Folgenden werden die Versuche zur Isolierung der "Core"-Peptide aus dem tryptischen Hydrolysat dargestellt. Die Blockierungsreaktionen werden in Kap. 5 behandelt.

4.2. Chromatographische Trennung der "Core"-Peptide

Das Vorhandensein des "Core"-Peptides III war, wie erwähnt, gesichert. Desweiteren ergab sich ein Hinweis auf das Vorliegen des 45 Aminosäuren langen Bruchstückes aus der Endgruppenbestimmung des "unlöslichen" Anteils nach Fällung mit Essigsäure.

Wegen der sehr ähnlichen, durch die Bromcyanpeptide bekannten Bruttozusammensetzung des "Core"-Bereiches von CTT-IV, verglichen mit dem entsprechenden von CTT-III, sollten ihre C-terminalen Peptide ähnliche Löslichkeitseigenschaften besitzen. Braig (31) fand bei der Untersuchung der tryptischen "Core"-Peptide der Komponente III nur in 6 molarer Essigsäure ein befriedigendes Lösungsmittel für die Gelfiltration. Eine Rechromatographie der "Core"-Fraktion an Sephadex mit demselben Elutionsmittel gelang nicht.

Eigene Lösungsversuche der "Core"-Peptide von CTT-IV mit 6 molarer Essigsäure waren nicht zufriedenstellend, dagegen erwies sich neben Lösen in 8 molarem Harnstoff insbesondere das Suspendieren des gespaltenen Globins oder der "Core"-Fraktionen in konzentrierter Propionsäure und Verdünnen mit Wasser auf etwa 3 molar als geeignet. Bemerkenswert ist, daß die hydrophoben Peptide auch nicht in konzentrierter oder der als Elutionsmittel verwendeten 3 M Propionsäure vollständig gelöst werden konnten.

Die Gelfiltration des gesamten Hydrolysates nach Lyophilisation wurde in 3 M Propionsäure durchgeführt. Die Auftrennung in vier Gipfel ist aus der Ninhydrinfärbung der einzelnen Fraktionen nach alkalischer Hydrolyse ersichtlich (Abb. 6, S. 18).

Da die "Core"-Peptide Tryptophan enthalten, waren für ihre Isolierung nur die Fraktionen mit starker Absorption bei 280 nm von Interesse. Das UV-Absorptionsprofil (Abb. 6) besitzt im Bereich der größeren Spaltstücke zwei nicht ganz voneinander getrennte, flächenmäßig etwa gleich große Gipfel, die auf einen ungefähr gleichen Anteil der "Core"-

Peptide I (Fraktion I) und III (Fraktion II) schließen lassen. Der Tryptophangehalt beider Fraktionen wurde durch Spektren und durch Farbtest bestätigt (s. Abb. 8). Die einheitliche Auftrennung in zwei Gipfel läßt nur eine geringe Menge des "Core"-Fragmentes II zu.

Folgende Endgruppen wurden gefunden:

Fraktion I: Gly, Ile (Ala)
Fraktion II: Ala, Ile, Gly (Leu)

Wiederholte Rechromatographien über Sephadex G-50 f führten nicht zu den reinen "Core"-Peptiden I und III.

Der Versuch, aus dem zweiten Gipfel (Abb. 6) durch Chromatographie über Ionenaustauscher das "Core"-Fragment III von den größeren löslichen Peptiden abzutrennen, gelang ebenfalls nicht. Um die lösungsvermittelnden Eigenschaften der Propionsäure auch bei der Chromatographie über SP-Sephadex auszunutzen, wurde sowohl mit Pyridin-Propionat- als auch mit Propionsäure-Gradienten gearbeitet("Säurecyclus"). Diese Versuche führten zwar nach alkalischer Hydrolyse der Fraktionen zu wohldefinierten Gipfeln, die Peptide waren aber aufgrund von Endgruppenbestimmungen und Analysen nicht einheitlich. Bei dem Pyridin-Propionat-Gradienten blieb das Peptidgemisch an die Säulenmatrix adsorbiert.

Da die Aggregationsneigung der "Core"-Fraktionen so stark war, daß auch durch wiederholte Rechromatographien keine weitere Reinigung zu erzielen war, wurden daraufhin Gelchromatographien in Harnstofflösungen durchgeführt. Um möglichst einheitliches "Core"-Peptid I entstehen zu lassen, wurde von den Standardbedingungen auf kürzere Spaltzeit und ein Trypsin:Proteinverhältnis von 1:100

(früher 2:100) übergegangen. Als zweckmässig hatte sich eine Spaltung von nur 50 min erwiesen. Beim Lösen des lyophilisierten Hydrolysates in 8-10 molarem Harnstoff wurde eine erhebliche Zunahme der Viskosität beobachtet (27,28). Es wurden daher weniger konzentrierte Lösungen als bei den vorangegangenen Versuchen aufgetragen. Abb. 10 zeigt eine Gelfiltration in 8 molarem Harnstoff, 1% Thiodiglykol sowie 1% Propionsäure als Elektrolyt.

Als Endgruppe des in Fraktion I enthaltenen Peptides wurde nach zweimaliger Entsalzung über Sephadex G-25 in 2 molarer Propionsäure Glycin und ein geringer Anteil Isoleucin gefunden. Glycin entspricht der Endgruppe des "Core"-Peptides I. Nach ε-Markierung mit Substanz IV (s. Kap. 6, autom. Sequenzanalyse) konnten im Sequenator 30 Abbauschritte dieses 45 Aminosäuren langen Peptides mit Erfolg vorgenommen werden. Da die Ausbeute sehr gering war, und eine Sequenz von 13 Aminosäuren unaufgeklärt blieb, wurde dann versucht, durch Modifizierung der Lysinreste von CTT-IV und anschließende tryptische Spaltung das 11 Aminosäuren kürzere Arg II (Pos. 102 - 136) zu isolieren.

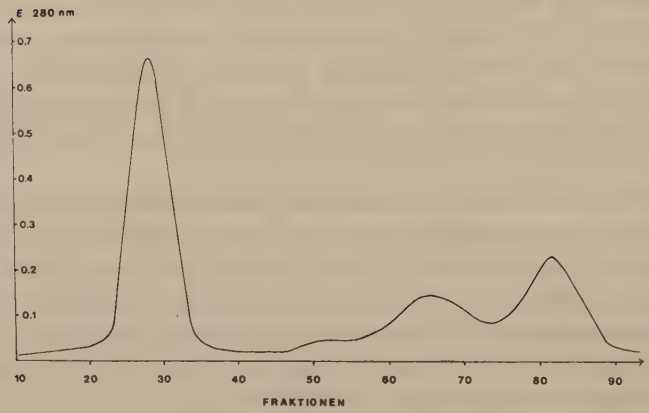


Abb. 10 Gelfiltration eines tryptischen Hydrolysates (50 mg, Spaltzeit 50 min) über Sephadex G-75. Säule: 1,5 x 180 cm, Elutionsmittel: 8 M Harnstoff mit 1% Propionsäure und 0,1% Thiodiglykol, Fraktionen: 3 ml, Absorption gemessen bei 280 nm.

5. "Argininspaltung"nach chemischer Modifizierung der Lysinreste

Durch chemische Modifizierung der Lysinreste von CTT-IV mit Dicarbonsäureanhydriden oder hydrophilen Senfölen wurde neben besseren Lösungseigenschaften fast vollständige Denaturierung erwartet. Bei anschließender tryptischer Spaltung sollten daher die Arginylbindungen gut zugänglich sein und die Spaltung drei durch Gelfiltration trennbare Peptide liefern.

5.1. Blockierungsreaktion mit Maleinsäureanhydrid

Butler und andere Autoren (29) fanden, daß die Acylierung mit Maleinsäureanhydrid spezifisch an den Lysin- und teilweise auch an den Serin- und Threoninresten erfolgt. Die Esterbindungen können aber durch milde Behandlung mit Hydroxylamin oder durch Inkubation bei pH 3,5 wieder gespalten werden, so daß ihre Bildung nicht als Nachteil angesehen werden kann. Je größer der Überschuß an Reagenz, desto mehr ist die Bildung von hydroxylaminlabilen Maleylesterbindungen der Serin- und Threoninreste begünstigt (30). Daher sollte das Protein in möglichst hochkonzentrierter Lösung mit dem geringsten Überschuß an Anhydrid umgesetzt werden, der bereits eine vollständige Maleylierung der Aminogruppen bewirkt. Die Umsetzung von CTT-IV wurde mit 20 fachem molarem Überschuß (bezogen auf Aminogruppen) bei pH 8,5 bis 9,0 durchgeführt (Versuchsbedingg. s. Exper. Teil). Das über Sephadex G-25 in 1%iger Ammoniumbicarbonatlösung entsalzte Protein wurde 3 h (Enzym : Proteinverhältnis 1:100) gespalten. Die Vollständigkeit der Reaktion ließ sich am Fingerprint (Abb. 11) abschätzen: dieser zeigte außer den drei Pepti-

den, die durch Spaltung des Proteins an den beiden Argininresten entstanden waren, einen schwächeren Fleck, der aufgrund seiner Position dem "chymotryptischen" Peptid T11a zugeordnet wurde. Durch unvollständige Blockierung der Lysinreste hervorgerufene Peptide waren - auch in Spuren - nicht vorhanden.

Als Endgruppen des Hydrolysates wurden Glycin und Alanin in etwa gleicher Intensität nachgewiesen (Dansylmethode). In der Sequenz folgt Glycin auf das Arginin in Pos. 90, Alanin auf das zweite Arginin in Pos. 101.

Das nach Blockierung und tryptischer Spaltung entstandene Hydrolysat wurde über Sephadex G-50 getrennt (Abb. 12), die Analysen der gekennzeichneten Fraktionen sind Tab. 5 zu entnehmen.

Da die Aminosäureanalyse des Peptides aus Gipfel I (Abb. 12) gut mit der theoretischen Zusammensetzung des Arg I übereinstimmt, darf man annehmen, daß nach dem ersten Arginin Pos. 90 quantitativ gespalten wurde.

Wahrscheinlich sind die nahezu identischen Analysen der Peptide von Gipfel I und II auf verschiedene Aggregationszustände desselben Peptides zurückzuführen. Die Zusammensetzung von Fraktion 52 kann dem durch unspezifische Spaltung nach Tyrosin Pos. 107 entstandenen "Core"-Peptid mit den Aminosäuren 108 - 136 zugeordnet werden. In Gipfel III liegt demnach ein Gemisch der Fragmente Pos. 102-136 und 108-136 vor. Durch tryptische Nachspaltung konnte das Ausmaß der Spaltung nach Tyrosin nicht so weit vergrößert werden, daß nach Rechromatographie über Sephadex die Isolierung des C-terminalen Peptides von Pos. 108 an möglich war. Das 11 Aminosäuren umfassende Arg II (=T10, Pos.91-101) zeigt nur geringe UV-Absorption und wurde erst in späteren Fraktionen eluiert.

Der Vorteil, den die Umsetzung der Aminogruppen mit Maleinsäureanhydrid gegenüber anderen Blockierungsmitteln bietet, liegt in der leichten Abspaltbarkeit der acylierenden Gruppe bei pH 3,5. Da anzunehmen war, daß die Reaktion

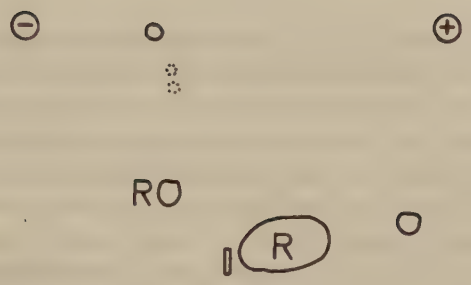


Abb. 11 Fingerprint von CTT-IV, nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid und anschließender tryptischer Spaltung. Versuchsbedg.: Elektrophorese pH 5,4, 70-80 mA, 2,5 kV, 3h. Chromatographie: n-Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser = 30:30:10:30. R= argininhaltiges Peptid

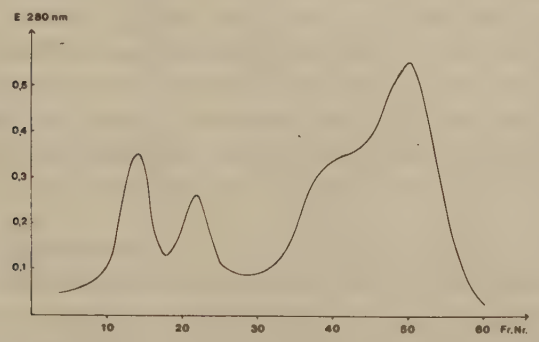


Abb. 12 Gelfiltration des Hydrolysats (nach Umsetzung des Globins mit Maleinsäureanhydrid und Spaltung mit Trypsin) über Sephadex G-50f, aufgetragene Substanz: 125 mg, Säule: 2 m x 2,5 cm, Elutionsmittel: 0,5 % NH_4HCO_3, Fraktionen: 3 ml/30 min. A=analysierte Fraktionen

unter den Bedingungen des Abbaus im Sequenator reversibel ist und die mit der Blockierung eingeführten hydrophilen Eigenschaften der Peptide verloren gehen, wurden die Versuche mit Blockierungsmitteln fortgesetzt, deren Reaktion an der ε-Aminogruppe des Lysins unter "Sequenatorbedingungen" irreversibel ist, wie bekannt war (23,24). Gleichzeitig wurde versucht, durch wesentlich kürzere Spaltzeit mit Trypsin die Spaltung nach Tyrosin in Pos. 107 so weit wie möglich auszuschalten und das Arg III-Peptid (Pos. 102-136) zu isolieren.

5.2. Blockierungsreaktion mit 5-(Isothiocyanato)benzol -1.3-Disulfonsäure (Substanz II)

Nachdem Braunitzer durch ε-Markierung mit sulfonsauren Senfölen der vollständige Abbau lysinhaltiger Peptide im Sequenator gelungen war (23,24)lag es nahe, die Lysinreste des Proteins mit einem dieser hydrophilen Senföle zu blockieren. Bei der darauffolgenden tryptischen Spaltung sollte die Polypeptidkette nur nach Argininresten gespalten werden. Die Umsetzung könnte außerdem die Isolation des schwerlöslichen und zur Aggregation neigenden "Core"-Peptides (Pos. 102-135) wesentlich erleichtern.

Die Umsetzung von CTT-IV mit 5-(Isothiocyanato)benzol - 1.3-Disufonsäure (Substanz II, Abb. 19) erfolgte nach der Vorschrift von Braunitzer (24) in Dimethylaminopropin oder Quadrolpuffer unter Zusatz von Triäthylamin. Nach Entfernung des überschüssigen Reagenzes durch Dialyse wurde das blockierte Protein lyophilisiert und bei einem Protein: Enzymverhältnis von 1:100 (w/w) 50 Minuten gespalten.

Als Endgruppen des tryptischen Hydrolysates wurden nur die Aminosäuren Glycin und Alanin nachgewiesen, die in der

Tab. 5: Analysen der in Abb. 12 (Trennung der Arginylpeptide) gekennzeichneten Fraktionen. Hydrolyse: 20 h mit 6n HCl. * bezeichnet die theoretische Zusammensetzung des Fragmentes Pos. 108-136 (Spaltung nach Tyrosin). Die eingeklammerten Werte sind bei der Ermittlung des Faktors nicht verwendet worden.
(x) = nach Sequenzanalyse geforderte Anzahl

Na 4	Fr.12	Arg.I	(X)	Fr.23	Fr.46	Arg.III	(X)	Fr.52	(*)
Lys	6,77	7		7,26	1,89	2		1,75	2
His	1,97	2		2,05	0,73	1		0,94	1
Arg	1,31	1		0,68	(0,27)	-		-	-
Asp	11,85	11		11,95	3,18	2		2,50	2
Thr	5,92	6		5,16	2,62	2		2,02	2
Ser	7,90	9		8,51	2,07	1		0,81	0
Glu	4,32	4		4,98	1,75	1		1,28	1
Pro	3,01	3		3,08	0,36	-		-	-
Gly	8,09	8		7,42	3,87	4		3,24	3
Ala	11,10	11		13,04	6,08	7		7,17	6
Val	6,77	7		5,70	2,86	2		1,48	1
Met	-	-		-	0,96	3		1,69	3
Ile	6,67	8		5,88	1,52	1?		(0,40)	-
Leu	4,13	4		4,07	1,84	1		1,24	1
Tyr	0,94	1		0,90	0,78	1		(0,40)	0
Phe	8,18	8		8,06	3,78	5		3,78	4

Sequenz- wie bereits bekannt war - auf die beiden Arginylreste folgen. Das Peptidgemisch wurde über Sephadex G-50f fraktioniert (Abb. 13).

Aufgrund der Endgruppenbestimmung war Fraktion II (4,5 mg) sehr uneinheitlich und wurde nicht weiter untersucht. Das Material aus IV war hygroskopisch. Nach Endgruppen zu urteilen, waren die "Core"-Peptide in Fraktion I und III (17,9 bzw. 12,6 mg) enthalten. Den charakteristischen Aminosäuren für den C-terminalen Bereich zufolge war der größte "Core"-Anteil in Fraktion I zu finden. Diese wurde über Sephadex G-100, die Peptide in Gipfel III über Sephadex G-25 mit 5% igem Pyridin bzw. 1 molarer Propionsäure als Elutionsmittel rechromatographiert (Abb.14 und 15).

Die Lösung in Pyridin war vollkommen klar. Dagegen mußte bei Verwendung der sauren Lösungsmittel jeweils ein ungelöster Rückstand abzentrifugiert werden. Aber auch im basischen System trat so starke Aggregation des C-terminalen Peptides auf, daß dieses mit dem Ausschlußvolumen von Sephadex G-100 eluiert wurde. Da nicht auszuschließen war, daß diese Aggregation bereits bei der Chromatographie in Essigsäure entstanden war, wurde bei einem zweiten Versuch mit nur 30 min tryptischer Spaltung für die erste Gelfiltration bereits 5% iges Pyridin als Lösungsmittel verwendet. Das Elutionsdiagramm ist in Abb. 16 wiedergegeben.

Auch hier tritt das Arg III-Peptid (Pos. 102-136) in stark aggregierter Form auf. Es wurde daher vor dem Arg I (90 AS) eluiert. Vermutlich waren die folgenden Gipfel durch das Arg III-Peptid in verschiedenen Aggregationszuständen verunreinigt. Ihre Analysen waren nicht eindeutig, so daß

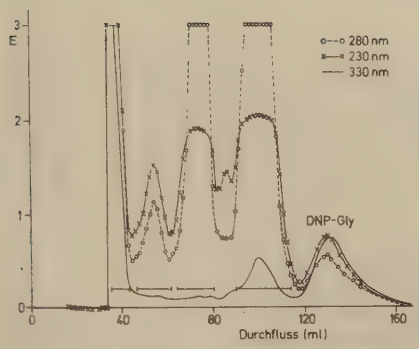


Abb. 13: Gelfiltration über Sephadex G-50f, Säule: 1,5 x 80 cm; Material: 68 mg CTT-IV, blockiert mit Substanz II (s. Abb. 17), tryptisch gespalten. Elutionsmittel: 1 M Essigsäure, Fraktionen: 1,3-1,4 ml, Extinktion gemessen bei 280 nm, 230 nm und 330 nm.

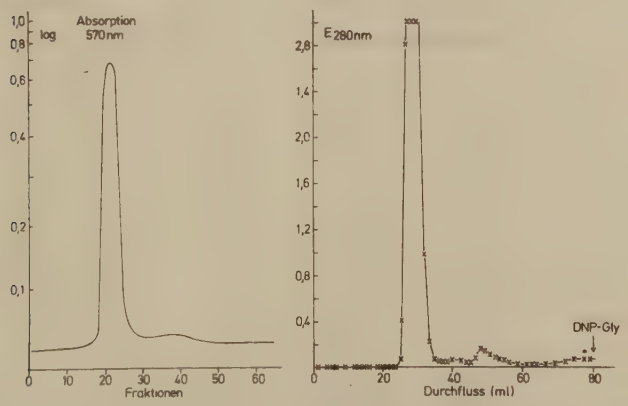


Abb. 14: Gelfiltration der Peptide aus Fraktion III (Abb. 13)über Sephadex G-25f. Säule: 1,5x80 cm, Elutionsmittel: 1 M Propionsäure, Fraktionen: 1,3 ml. Extinktion gemessen bei 280 nm und 570 nm (Ninhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse).

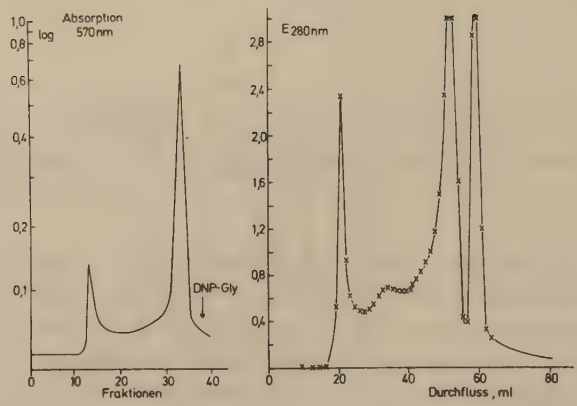


Abb. 15: Rechromatographie der Peptide aus Fraktion I (Abb.13)über Sephadex G-100 in 5%igem Pyridin. Aufgetragen: 17,9 mg, Säule: 0,9x70 cm, Fraktionen: 1,3 ml. Absorption gemessen bei 57o nm (Ninhydrinfärbung) und 280 nm.

Tab. 6: Analyse des Peptids aus Fraktion I (Abb.13); Hydrolyse: 20 h mit 6n HCl (x)=nach Sequenzanalyse geforderte Anzahl Aminosäuren

		(X)
Lys	1,29	(2)
His	1,10	(1)
Arg	0,09	(0)
Asp	3,22	(2)
Thr	2,02	(2)
Ser	1,47	(1)
Glu	1,19	(1)
Gly	3,87	(4)
Ala	6,45	(6)
Val	2,39	(2)
Met	1,29	(2)
Ile	0,73	(0)?
Leu	1,38	(1)
Tyr	0,73	(1)
Phe	4,70	(5)

sie ohne Rechromatographie nicht bestimmten Sequenzbereichen zugeordnet werden konnten. Da aber nur das C-terminale Peptid für die Vervollständigung der Sequenz erforderlich war, wurden die Untersuchungen der übrigen Gipfel nicht weiter fortgesetzt.

Fraktion I (Abb. 15) ergab eine zufriedenstellende Analyse des 35 Aminosäuren langen, durch Spaltung nach dem zweiten Arginin entstandenen C-terminalen Peptides (Tab. 3 und 6).

Der Abbau des so gewonnenen Peptids (Arg III) im Sequenator gelang nicht.

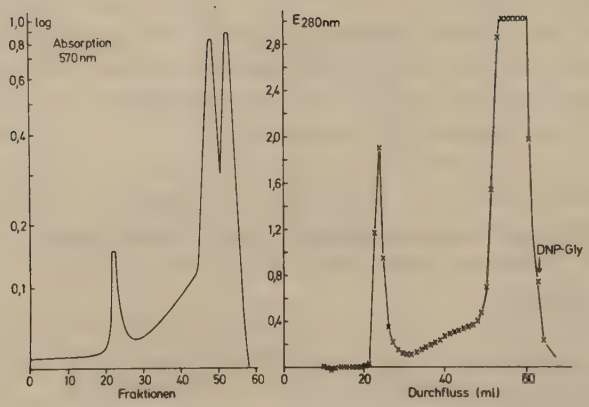


Abb. 16: Gelfiltration über Sephadex G-100, Säule: 0,9x 70 cm; Substanz: 20 mg CTT-IV, blockiert mit Substanz II (s. Abb.17), tryptisch gespalten (30 min). Fraktionen: 1,1-1,2 ml. Absorption gemessen bei 280 nm und 570 nm (Ninhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse). Elutionsmittel: 5%iges Pyridin.

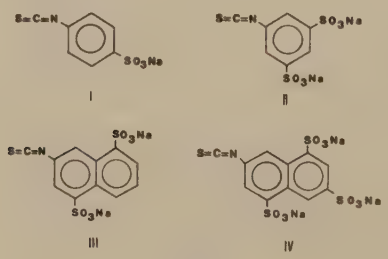


Abb. 17: Substanzen I-IV (sulfonierte Senföle der Benzol- und Naphtalinreihe) für die ε-Markierung nach Braunitzer (23,24).

6. Automatische Sequenzanalyse

Die wirksamste Methode für die Sequenzanalyse stellt die von Edman entwickelte Abbautechnik dar. In dem von Edman und Begg (10) entwickelten Sequenator wird das Programm für die Abspaltung und die Abtrennung der Spaltungsprodukte automatisch gesteuert. Ausbeuten von 98% lassen nicht einen unbegrenzten Abbau eines Proteins oder größeren Peptids zu. Der chemische Reaktionsablauf erlaubt z.Zt. 60 Abbauschritte. Es werden jedoch hohe Anforderungen an die Reinheit des Proteins gestellt. In der Praxis liegt die Zahl der erfolgreichen Abbauschritte meist zwischen 20 und 50.

Der Abbau kleinerer Proteine oder Peptide mit 2-40 Aminosäuren ist problematisch, weil sie bei der Extraktion der Reagenzien aus dem Becher eluiert werden. Braunitzer (23,24) löste dieses Problem durch chemische Modifizierung der ε -Aminogruppen der Lysylreste mit sulfonierten Senfölen (s. Abb. 17) (23,24). Durch den hydrophilen Charakter der eingeführten Gruppe wird die Löslichkeit in apolaren Lösungsmitteln herabgesetzt.

Die Sequenzanalyse des CTT-IV wurde bisher ausschließlich automatisch durchgeführt. Von einem der beiden Arginylpeptide konnte die Sequenz als Teilbereich eines größeren Lysylpeptids bestimmt werden. An dem 22 Aminosäuren umfassenden Arginylpeptid T9 gelangen nur 8 erfolgreiche Abbauschritte. Die PTH-Aminosäuren wurden durch Dünnschichtchromatographie und teilweise zusätzlich durch Gaschromatographie identifiziert. Bei dieser Methode wurden einige PTH-Aminosäuren als Trimethylsilyl-Derivate nachgewiesen.

Die Folge der tryptischen Peptide innerhalb der Kette wurde aufgrund ihrer Homologien zu CTT-III festgelegt. Wie in der Diskussion ausgeführt wird, war nach Analyse der BrCN- und Arginylpeptide und der automatischen Sequenzanalyse am Protein nur die Reihenfolge von drei kleineren tryptischen Peptiden (Pos. 45-68) nicht sicher.

Durch den Edman-Abbau am Protein wurden die N-terminalen 38 Aminosäuren bestimmt, die außerdem durch die Sequenzanalyse von "T1+T2" und T4 bestätigt wurden. Die Sequenz von T3 wurde nur am Protein erhalten.

Die Primärstruktur von CTT-IV ist bis auf die beiden Bereiche Pos. 78-90 aus dem tryptischen Arginylpeptid T9 und Pos. 121-134 aus dem "Core" aufgeklärt worden.

6.1. Vorbehandlung der tryptischen Lysylpeptide

Zur Sequenzermittlung der Peptide wurden die ε - Aminogruppen der C-terminalen Lysinreste mit den sulfonierten Senfölen des Benzols (I und II) und Naphtalins (III und IV) umgesetzt (s. Abb. 17) (23,24). Bei der ε-Markierung kamen die Varianten A und B der Methode in Abhängigkeit von der Größe des Peptides oder der Anwesenheit von Pyridinpuffer in der Peptidlösung zur Anwendung (24). Die Variante B arbeitet mit einem größeren Reagenzüberschuß, der dann über Sephadex G-10 und G-15 von dem Derivat getrennt wird, während das nach Variante A umgesetzte Peptid direkt in den Becher des Sequenators eingetragen und analysiert wird.

Die Vorschrift für die Umsetzung der Lysylpeptide ist im experimentellen Teil angegeben. Diese wurde von mir nicht selbst durchgeführt. Das Ergebnis der Sequenzanalyse der tryptischen Peptide ist in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7: Sequenz der einzelnen tryptischen Peptide von CTT-IV. Die Folge der Aminosäuren im Arginylpeptid T10 wurde durch Sequenzanalyse des "Core"-Peptids I (T 10 - T 12) erhalten.

Peptid	Anzahl AS	Pos.	Sequenz
"T1+T2"	17	1 - 17	Leu-Thr-Ala-Asp-Gln-Ile-Ser-Thr--Val-Gln-Ser-Ser-Phe-Ala-Gly-Val--Lys
T3	12	18 - 29	Gly-Asp-Ala-Val-Gly-Ile-Leu-Tyr--Ala-Val-Phe-Lys
T4	8	30 - 37	Ala-Asp-Pro-Ser-Ile-Gln-Ala-Lys
T5	7	38 - 44	Phe-Thr-Gln-Phe-Ala-Gly-Lys
T6	6	45 - 50	Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Lys
T7	11	51 - 61	Gly-Ser-Ala-Asp-Phe-Ser-Ala-His--Ala-Asn-Lys
T8	7	62 - 68	Ile-Val-Gly-Phe-Phe-Ser-Lys
T9	22	69 - 90	Ile-Ile-Gly-Asp-Leu-Pro-Asn-Ile--(Thr,Gly,Asx,Val,Asx,Thr,Phe,Val, Ala,Ser,His,Thr,Pro,Arg)
T10	11	91 - 101	Gly-Val-Thr-His-Asn-Gln-Leu-Asn--Asn-Phe-Arg
T11	8	102 - 109	Ala-Gly-Phe-Val-Ser-Tyr-Met-Lys
T10-T12	45	91 - 135	Gly-Val-Thr-His-Asn-Gln-Leu-Asn--Asn-Phe-Arg-Ala-Gly-Phe-Val-Ser--Tyr-Met-Lys-Ala-His-Thr-Asp-Phe--Gly-Ala-Ala-Glu-(Ala)Try(Ala,Gly, Thr,Ala,Leu,Asp,Ala,Phe,Phe,Gly, Met,Val,Phe,Ala,Lys)
T13	1	136	Met

Tab. 8: Sequenz von CTT-IV. Außer den isolierten tryptischen Peptiden sind die nach "Arginin-" und Bromcyanspaltung erhaltenen Fragmente gekennzeichnet.

```
I                                                   10
Leu-Thr-Ala-Asp-Gln-Ile-Ser-Thr-Val-Gln-Ser-Ser-Phe-Ala-Gly-
                    "T1+T2"
                                                Arg I
                                                BrCN 1
                    20                                                  30
-Val-Lys-Gly-Asp-Ala-Val-Gly-Ile-Leu-Tyr-Ala-Val-Phe-Lys-Ala
                                T3
                                                Arg I
                                                                BrCN 1
                                                40
-Asp-Pro-Ser-Ile-Glu-Ala-Lys-Phe-Thr-Gln-Phe-Ala-Gly-Lys-Asp
          T4                                    T5
                                                Arg I
                                BrCN 1
                    50                                                  60
-Leu-Asp-Ser-Ile-Lys-Gly-Ser-Ala-Asp-Phe-Ser-Ala-His-Ala-Asn
        T6                                    T7
                                                                Arg I
BrCN1
                                                70
-Lys-Ile-Val-Gly-Phe-Phe-Ser-Lys-Ile-Ile-Gly-Asp-Leu-Pro-Asn
                    T8                                    T9
                                Arg I
BrCN1
                    80                                                  90
-Ile(Thr,Gly,Asx,Val,Asx,Thr,Phe,Val,Ala,His,Thr,Pro,Arg)Gly
Arg I                                                   Arg I
                    BrCN
                                                100
Gly-Val-Thr-His-Asn-Gln-Leu-Asn-Asn-Phe-Arg-Ala-Gly-Phe-Val-
                    "Core"-Peptid I
          T10                                           T11
                                                                Arg III
                    BrCN 1
                    110                                                 120
-Ser-Tyr-Met-Lys-Ala-His-Thr-Asp-Phe-Gly-Ala-Ala-Glu(Ala)-Try-
      T11
                                Arg III
                                BrCN 2
                                                130                     136
(Ala,Gly,Thr,Ala,Leu,Asp,Ala,Phe,Phe,Gly,Met,Val,Phe,Ala)Lys-Met
                                "Core"-Peptid I
                                                                                T13
                                                Arg III
                BrCN2                                           BrCN3
```

Diskussion

Aus einem Vergleich der Primärstrukturen von CTT-III und CTT-IV (Tab. 9) geht die phylogenetische Verwandtschaft hervor. Bei einer Kettenlänge von je 136 Aminosäuren wurden bisher 13 Austausche gefunden. Für die beiden in ihrer Sequenz unbekannten Bereiche (Pos. 77 - 90 und 121 - 134) müssen aufgrund der unterschiedlichen Aminosäureanalysen mindestens sechs weitere Austausche gefordert werden. Sieben Austausche werden durch die Änderung von mehr als einer Base in den entsprechenden Codons der DNA hervorgerufen (s. Tab. 10).

Von den beiden unaufgeklärten Sequenzbereichen liegt der erste im Arginylpeptid T9, das im Gegensatz zu dem entsprechenden "ditryptischen" T9 von CTT-III nicht die ε-Markierung nach Braunitzer (23, 24) erlaubt. Durch den Abbau der ersten 8 Aminosäuren dieses Peptides konnte der Gehalt an Isoleucin [3] bestimmt werden, der gemäß den Analysen nach 20 und 300 Stunden Hydrolysedauer unklar geblieben war (s. Tab. 3). Das Vorhandensein zweier Polypeptidketten, die sich durch Insertion eines Isoleucins unterscheiden, konnte bei CTT-IV durch Sequenzanalyse ausgeschlossen werden.

Tab. 9: Homologe Zuordnung der Insektenhämoglobine CTT-III und CTT-I und der Hämoglobin α-Kette des Menschen.

	NA			A								10							
CTT-IV			Leu	Thr	Ala	Aps	Gln	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Ser	Ser	Phe	Ala	Gly	Val	Lys
CTT-III			Leu	Ser	Ala	Asp	Gln	Ile			Val	Gln	Ala	Ser	Phe	Asp	Lys	Val	Lys
α-	Val		Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Try	Gly	Lys	Val	Gly

		B					20										30	C	
CTT-IV					Gly	Asp	Ala	Val	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Lys	Ala	Asp	Pro
CTT-III					Gly	Asp	Pro	Val	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Lys	Ala	Asp	Pro
α-	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro

						CD		40						D				50
CTT-IV	Ser	Ile	Glu	Ala	Lys	Phe	Thr	Gln	Phe		Ala	Gly	Lys	Asp	Leu	Asp	Ser	Ile	Lys
CTT-III	Ser	Ile	Met	Ala	Lys	Phe	Thr	Gln	Phe		Ala	Gly	Lys	Asp	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys
α-	Thr	Thr	Lys	Thr	Thr	Phe	Pro	His	Phe		Asp	Leu	Ser	His					

		E								60									
CTT-IV	Gly	Ser	Ala	Asp	Phe	Ser	Ala	His	Ala	Asn	Lys	Ile	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Lys	Ile
CTT-III	Gly	Thr	Ala	Pro	Phe	His	Ile/ Thr	Glu	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Lys	Ile
α-	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val

	70		EF								F	80							
CTT-IV	Ile	Gly	Asp	Leu	Pro	Asn	Ile	(Thr,	Gly,	Asx,	Val,	Asx,	Thr,	Phe,	Val,	Ala,	Ser,	His,	Thr,
CTT-III	Ile	Gly	Glu	Leu	Pro	Asn	Ile	Glu	Ala	Asp	Val	Asn	Thr	Phe	Val	Ala	Ser	His	Lys
α-	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala

	FG		90			G					100							
CTT-IV	Pro		Arg	Gly	Val	Thr	His	Asn	Gln	Leu	Asn	Asn	Phe	Arg	Ala	Gly	Phe	Val
CTT-III	Pro		Arg	Gly	Val	Thr	His	Asx	Glx	Leu	Asx	The	Arg	Ala	Ala	Gly	Phe	Val
α-	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu

					110		GH					H					120	
CTT-IV	Ser	Tyr	Met	Lys	Ala	His			Thr	Asp	Phe	Gly	Ala	Ala	Glu		(Ala)	Try
CTT-III	Ser	Tyr	Met	Lys	Ala	His			Thr	Asp	Phe	Gly	Ala	Ala	Glu		Ala	Ala
α-	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ala	Ser

										130						136		
CTT-IV	Ala	Gly	Thr	Ala	Leu	Asp	Ala	Phe	Phe	Gly	Met	Val	Phe	Ala	Lys	Met		
CTT-III	Try	Gly	Thr	Leu	Ala	Asp	Thr	Phe	Phe	Gly	Met	Ile	Phe	Ser	Lys	Met		
α-	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg	

Tab. 10: Aminosäureaustausche zwischen CTT-III und CTT-IV.
1) nicht sequenzierte Bereiche

Peptid	Pos.	Austausche Pos.	CTT-III	CTT-IV	Basendifferenzen in der DNA	CTT-III	Codons CTT-IV
T1+T2	1-17	2	Ser	Thr	1	AGU,AGC	ACX
		11	Ala	Ser	> 1	GCX	AGU,AGC
		14	Asp	Ala	1	GAU,GAC	GCX
		15	Lys	Gly	> 1	AAA,AAG	GGX
T3	18-29	20	Pro	Ala	1	CCX	GCX
T4	30-37	35	Met	Glu	> 1	AUG	GAA,GAG
T5	38-44	-	-	-			
T6	45-50	47	Glu	Asp	1	GAA,GAG	GAU,GAC
T7	51-61	52	Thr	Ser	1	ACX	AGU,AGC
		54	Pro	Asp	>1	CCX	GAU,GAC
		57	Ile+/ Thr	Ala	>1+	AU(U,C,A) ACX	GCX GCX
		58	Glu	His	>1	GAA,GAG	CAU,CAC
		61	Arg	Lys	>1	CGX	AAA,AAG
T8	62-68	-	-	-			
T9	69-76	72	Glu	Asp	1	GAA,GAG	GAU,GAC
	(77-90)1)	mind. 3 Austausche					
T10	91-101	-	-	-			
T11	102-109	-	-	-			
T11-T13	102-120	-	-	-			
	(121-136)1)	mind. 3 Austausche					

Der vollständige automatische Abbau argininhaltiger Peptide wird z.Zt. noch bearbeitet, so daß die Aufklärung dieses Teilbereiches der Sequenz bald gelingen dürfte.

Der zweite Bereich umfaßt die Pos. 121 - 134 des "Core"-Peptides II. Während von dem 45 Aminosäuren langen "Core"-Peptid I (Pos. 91 - 135) 30 Schritte bis einschließlich Tryptophan Pos. 120 erfolgreich abgebaut werden konnten, gelang die Sequenzermittlung nicht an dem 10 Aminosäuren kürzeren Arg III (Pos. 102 - 136), das nach der Blockierung des Proteins mit Substanz II und anschließender Spaltung mit Trypsin erhalten wurde. Dieses Peptid enthält zwei modifizierte Lysinreste. Es blieb unklar, warum sich dieses anders als das längere "Core"-Peptid verhielt, das nach seiner Isolierung mit Substanz IV bzw. II umgesetzt wurde.

Im Kapitel 6 wurde ausgeführt, daß die Reihenfolge der tryptischen Peptide von CTT-IV analog zur Komponente III festgelegt wurde. Durch die nach "Methionin"- und "Arginin"-Spaltung erhaltenen Fragmente konnte diese Zuordnung jedoch weitgehend gesichert werden:

Der Edman-Abbau vom N-Terminus bis Pos. 38 legte die Folge von T1 - T5 fest. Da BrCN1 jeweils ein Arginin, ein Tyrosin und Methionin mehr enthält als Arg I (s. Tab. 5), muß das 22 Aminosäuren lange Arginylpeptid T9 den C-Terminus von Arg I bilden, während T10 als das zweite argininhaltige Peptid und T11 folgen müssen. BrCN2 und BrCN3 enthalten jeweils nur ein Lysin. Wie im Kap. 3 ausgeführt wurde, muß das C-terminale Bromcyanpeptid mit der Sequenz Lys-Met enden. Da BrCN2 Lysin N-terminal besitzt, muß die Folge der Bromcyanpeptide 1, 2, 3 lauten. Nach dieser Festlegung bleibt nur noch die Reihenfolge der tryptischen Peptide T6 - T8 innerhalb von Arg I unklar. Von den bisher bekannten spezifischen Spaltungen nach chemischen Modifizierungen war keine geeignet, die Stellung dieser Peptide festzulegen. Ohne die Analogie zu CTT-III hätte also das Arginylpeptid I z.B. mit Chymotrypsin oder Pepsin nachgespalten werden müssen.

Verteilung von Aminosäuren

CTT-IV besitzt 14 Phenylalaninreste, die den stark hydrophoben Charakter des "Cores" bedingen. Die charakteristische Verteilung der Seitenketten am N-terminalen Ende der Helices, die für die Hämoglobine beschrieben wurde (33), wird auch bei CTT-III und CTT-IV gefunden. Position 1 einer Helix ist in den meisten Fällen (s.u.) durch Aminosäuren besetzt, deren Seitenketten eine H_2-Bindung mit der Iminogruppe des Restes 4 der Hauptkette bilden können: Threonin (A1,2) in Helix A, Asparaginsäure (B5,19) Helix B, Asparaginsäure (C1,31) Helix C, Asparaginsäure (D1,45), Helix D, Serin (E1,52) Helix E, Threonin (G1,93) Helix G. In diesen Positionen treten zwischen CTT-III und CTT-IV nur ein Serin $\longrightarrow$ Threonin und ein Threonin $\longrightarrow$ Serin-Austausch auf.

Die Hämgruppe und ihre Umgebung

Unter den Aminosäuren, die nach Perutz (34,35) einen Kontakt zur Hämgruppe ausüben, sind bei CTT-IV 7 Phenylalanine, die entsprechend ihrer Position die Hämtasche abgrenzen, während bei Vertebraten nur 3 auftreten. Beim Myoglobin ist Phe nur zweimal an einem Hämkontakt beteiligt. Durch die Sequenzanalyse von CTT-III (2) wurde der Austausch des invarianten Histidins E7 gegen Glutaminsäure gefunden und durch Röntgenstrukturanalyse (3) festgestellt, daß der Hämkontakt von dem Isoleucin in Position E11 ausgeht, welches durch die Abwesenheit des Histidins in E7 eine andere Position und Konformation einnehmen kann. Bei CTT-IV finden wir sowohl das Histidin in E7 als auch das Isoleucin in E11. Es wird vermutet, daß das Histidin E7 bei CTT-IV wieder den Hämkontakt herstellt, zumal der Isoleucinrest nicht die gleiche Art der Wechselwirkung mit der Hämgruppe ausüben kann wie der Imidazolring eines Histidins.

Die Hämkontakte sind bei CTT-IV wie bei den Vertebraten-Hämoglobinen bis auf den polaren Kontakt, der vom Arginin (FG3,90) ausgeht, unpolarer Natur. Von den bei Wirbeltieren in der Hämumgebung auftretenden "invarianten" Resten sind im CTT-IV Molekül nur das distale (E7) und proximale (F8) Histidin sowie Phenylalanin in CD1 erhalten. Verglichen mit den Vertebraten-Hämoglobinen ist die Zahl der invarianten Aminosäuren demnach stark reduziert.

Erwartete Strukturänderungen gegenüber Myoglobin

Mit Hilfe der Röntgenanalyse wurde ein quantitativer Vergleich zwischen der Komponente III und dem Myoglobin durchgeführt (32). Zwischen CTT-III und CTT-IV wird die größte

Anzahl identischer Aminosäuren erhalten, wenn für beide Komponenten die gleichen Deletionen gegenüber den Vertebraten-Hämoglobinen angenommen werden. Daher dürften die strukturellen Veränderungen von CTT-III gegenüber Myoglobin, hauptsächlich durch Deletionen hervorgerufen, für CTT-IV im wesentlichen die gleichen sein. Diese Annahme ist sehr wahrscheinlich, weil die Deletionen in Bereichen auftreten, welche in beiden Hämoglobinen besonders konstant sind.

Durch die Deletion von vier Aminosäuren in der AB, B Region ist auch bei CTT-IV mit einer veränderten Anordnung der ganzen B-Helix zu rechnen. Das in allen Vertebraten-Hämoglobinen invariante Glycin B6 ist bei CTT-III durch Prolin, in CTT-IV durch Alanin ersetzt. Durch die veränderte Lage der B-Helix liegt bei CTT-III die C-Helix näher an der Hämgruppe als beim Myoglobin. Die Seitenketten in F8 und FG3-FG5 bilden wichtige Hämkontakte aus und sind bei beiden Chironomus-Hämoglobinen identisch. Ihre Positionen sind bei CTT-III gegenüber dem Myoglobin unverändert. Helix G sollte ebenfalls eine ähnliche Tertiärstruktur haben wie in CTT-III und Myoglobin, wohingegen im GH-Bereich und am N-terminalen Ende der H-Helix wegen der Deletionen von zwei bzw. einer Aminosäure strukturelle Änderungen im Hämoglobin III gegenüber Myoglobin vorliegen. Dieser Teil der Polypeptidkette ist identisch in CTT-III und CTT-IV. Der C-Terminus wird bei CTT-IV wie bei CTT-III von Methionin gebildet, welches bei CTT-III dieselbe Position einnimmt wie das bei Vertebraten-Hämoglobinen und Myoglobin invariante Tyrosin (H22) und dieselbe Funktion ausüben kann, nämlich die Abschirmung der Hämtasche gegen Wasser (37). Einige strukturelle Unterschiede zwischen CTT-III und CTT-IV sind in der E-Helix zu erwarten. In diesem Bereich sind von 11

Aminosäuren 6 ausgetauscht. Das Histidin befindet sich bei CTT-IV wieder in Position E7 (CTT-III ⟶ Glu) und es dürfte daher ein wesentlicher Unterschied gegenüber CTT-III in der Art des Hämkomplexes bestehen (s. Hämgruppe und ihre Umgebung).

Überlegungen zum Bohreffekt

Durch Untersuchungen an den monomer vorliegenden Hämoglobinen CTT-III und CTT-IV wurde ein alkalischer Bohreffekt nachgewiesen (36). Demnach müssen diese Moleküle in zwei verschiedenen Konformationen auftreten, welche sich in ihrer Sauerstoffaffinität unterscheiden und bei nicht aggregierten Molekülen nur durch Änderung der Tertiärstruktur erreicht werden können. Dies widerspricht jedoch der Theorie von Monod, Wyman u.a.. Aus den thermodynamischen Daten der Sauerstoffbindung der Hämoglobine CTT-III und CTT-IV (36) geht hervor, daß die heterotrope Wechselwirkungsenergie bei CTT-IV etwa doppelt so groß ist wie bei CTT-III. Folglich sollten trotz der großen Ähnlichkeit ihrer Primärstrukturen unterschiedliche Wechselwirkungen innerhalb der beiden Moleküle den vergrößerten Bohreffekt bei CTT-IV bewirken. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen war es möglich, mit Hilfe der Sequenz (2) und des Röntgenstrukturmodells (3) einen Mechanismus des Bohreffektes für das Insektenhämoglobin CTT-III zu formulieren, der in den Grundzügen mit dem von Perutz beschriebenen (37) übereinstimmt:

Für CTT-III wird eine Wechselwirkung zwischen Histidin G19 und Tyrosin G15 angenommen. Histidin G19 ist daher bei CTT-III an dem molekularen Mechanismus des Bohreffektes nicht beteiligt. Beide Aminosäuren nehmen die gleiche Position in CTT-IV ein. Sie befinden sich außerdem in

identischen Sequenzbereichen, so daß die Wechselwirkung zwischen Histidin G19 und Tyrosin G15 auch in CTT-IV wahrscheinlich ist. Bei CTT-III ist das Histidin E5 ebenfalls an dem Mechanismus unbeteiligt. Dieses Histidin kann mit dem Asparagin E9 auf der dem Häm abgewandten Seite eine Wasserstoffbindung bilden und kann daher in seinem pK-Wert von dem 6. Liganden nicht beeinflußt werden. In der E-Helix liegen jedoch zwischen CTT-III und CTT-IV wesentliche Sequenzunterschiede vor (s. Tab. 9), die wahrscheinlich für den größeren Bohreffekt (CTT-IV: 0,42, CTT-III: 0,28) verantwortlich sind. In CTT-IV nimmt das Histidin nicht die Position E5 sondern E7 ein, und eine intrahelicale Wasserstoffbindung wie zwischen His E5 und Asn E9 in CTT-III zum Asparagin E9 (CTT-IV) ist dadurch unmöglich. His E7 (CTT-IV) könnte daher an dem Mechanismus des Bohreffektes beim Hämoglobin IV beteiligt sein, zumindest kann die Beeinflussung des pK-Wertes dieses Histidinrestes durch den 6. Liganden nicht aus den gleichen Gründen wie bei CTT-III ausgeschlossen werden. Das Bohrproton wird in CTT-III von dem Histidin G2 gebunden, welches nach dem Atommodell in der Nähe des C-Terminus liegt. Das Konformationsgleichgewicht ist abhängig von den His G2-Met H22 und His G2-Phe H19 Wechselwirkungen. His G2 und Met H22 sind auch im CTT-IV Molekül vorhanden, Phe H19 sehr wahrscheinlich (s. Tab. 8). Zur Erklärung des veränderten Bohreffektes sind jedoch andere als die soeben angeführten oder zusätzliche Wechselwirkungen erforderlich. Ein Hinweis darauf ergibt sich aus dem Befund, daß der Bohreffekt bei CTT-IV auch nach Abspaltung des Methionins H22 bestehen bleibt (43). Bei CTT-III sind die folgenden Gruppen an der negativen Wechselwirkung zwischen der 6. Koordinationsstelle des Eisens und dem Bohr-Proton-Bindungsort beteiligt: Fe, Imidazol des His F8, Phe F4, Met H22, His G2 und Phe H19.

Die molekulare Deutung des Bohreffektes von CTT-IV steht noch aus, doch liegt die Vermutung nahe, daß der gegenüber CTT-III stark veränderte N-terminale Bereich der E-Helix für den Mechanismus eine Rolle spielt.

Experimenteller Teil

1. Isolierung und Charakterisierung von CTT-IV

1.1. Monomeren-Dimeren Trennung

Die Trennung des Hämoglobin-Rohextraktes (s. 6) von Chironomus th.th. wird über Sephadex G-75 bei 4°C ausgeführt. Der für die präparativen Trennungen der Hämoglobine (Säule: 90-100 x 10 cm) verwendete 0,025 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0 ist entlüftet, CO gesättigt und mit 1‰ Thiodiglykol versetzt. Es werden 10-12 g des Rohextraktes der Lymphe in 90-100 ml Äquilibrierpuffer gelöst, die Ferri-Form des Häms wird mit dem etwa 20 fachen M Überschuß an Natriumdithionit reduziert und durch anschließendes Sättigen der Lösung mit CO ligandiert. Die so vorbereitete Lösung wird in der Säule analysiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 80-90 ml/Stunde. Die vereinigten Fraktionen der getrennten monomeren Hämoglobine werden 24 Stunden dialysiert und lyophilisiert, durch Druckdialyse konzentriert oder als Niederschlag nach Fällung mit Ammoniumsulfat aufbewahrt.

1.2. Chromatographie der Monomeren-Fraktion

Die von Whatman bezogene DEAE-Cellulose DE 52 wird gemäß der Arbeitsanleitung vorbehandelt. Der Äquilibrierpuffer und die Gradienten werden durch Verdünnen einer 1/10 M Tris-Maleat Stammlösung pH 8,6 hergestellt. Die Ligandierung der Hämoglobine mit CO geschieht wie unter 1.1. beschrieben. Die verdünnten, nachtitrierten Puffer werden mit 1‰ Thiodiglykol versetzt, entlüftet, gekühlt und mit Kohlenmonoxid gesättigt.

Zur Trennung der monomeren Hämoglobine wird eine Säule mit den Maßen 30-35 x 5 cm verwendet und 2,5-2,8 g, gelöst in 90-100 ml Puffer, aufgetragen. Das Volumen des Mischgefäßes beträgt 200 ml, die Elutionsgeschwindigkeit 25 - 30 ml/Stunde.

Als Äquilibrierpuffer dient eine 0,9/1000 M Tris-Maleat-Lösung pH 8,6,der erste Gradient nach Elution der Komponente IIIA ist eine 1,8 M Tris-Maleat- und der nach Elution der Komponente III angelegte zweite Gradient eine 3,6 M Tris-Maleat-Lösung pH 8,6. Die Ionenstärke der aufzutragenden Lösung ist niedriger, der pH-Wert etwas höher als der des Äquilibrierpuffers.

1.3. Analytische diskontinuierliche Elektrophorese

Die Trennungen werden mit einer der handelsüblichen Elektrophoresekammern ausgeführt. Zur Herstellung eines 10% igen Geles werden die unten angegebenen Lösungen im Verhältnis A:B:C:D = 1:2:1:4 gemischt und entsprechend der Anleitung von Maurer (14) weiterverarbeitet. Zur Trennung der Hämoglobine kann auf Sammelgele verzichtet werden, wenn der Probe etwas Saccharose oder Glycerin zugesetzt wird.
Die Färbung und Entfärbung der Gele wird nach Maurer (14) durchgeführt.

Die Stammlösungen zur Herstellung des Gels entsprechen dem System I von Maurer:

Lösung A: 36,3 g Trishydroxymethyl-aminomethan
48 ml I n HCl
0,46 ml Tetramethyl-äthylendiamin
mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen,
pH-Wert 8,9-9,0

Lösung B: 40 g Acrylamid
0,8 g NN'-Methylenbisacrylamid
10-15 mg Kaliumhexacyanoferrat III
mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen

Lösung C: destilliertes Wasser

Lösung D: 0,14 g Ammoniumperoxidisulfat in 100 ml destilliertem Wasser

Elektrophoresepuffer: 28,8 g Glycin und 6,0 g Tris, gelöst in 1 l destilliertem Wasser.

2. Spaltung mit Trypsin

Die Spaltung wurde unter etwas modifizierten Bedingungen nach Liebold und Braunitzer durchgeführt (42).

Das Globin (29,5 μ Mol) wird nach Hitzedenaturierung in 0,5% iger Ammoniumbicarbonatlösung mit 2 Gewichtsprozent TPCK-Trypsin gespalten. Der pH-Wert des Spaltgemisches wird im Autotitrator (Radiometer, Kopenhagen) durch Zugabe von 0,1 n Natronlauge konstant bei 9,0 gehalten. Bei einer Temperatur von 37°C beträgt die Spaltzeit 5 Stunden. Zur Beendigung der Spaltung wird das tryptische Hydrolysat eingefroren und lyophilisiert.

Zur Isolierung des "Core"-Peptides I (Pos. 91 - 135) ist eine Spaltzeit von 50 min bei nur 1 Gewichtsprozent Trypsinzugabe unter obigen Bedingungen geeignet.

Die tryptische Spaltung des an den ε-Aminogruppen der Lysinreste mit Maleinsäureanhydrid oder 5-(Isothiocyanato)benzol-1.3. disulfonsäure (Substanz II, s. Abb.17) umgesetzten Proteins wird mit 1 Gewichtsprozent TPCK-Trypsin und verkürzten Spaltzeiten unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Das maleylierte Protein wird 3 Stunden, das mit Substanz II ε-markierte Protein 50 und 30 min gespalten.

3. Chemische Reaktionen an CTT-IV

3.1. Bromcyanspaltung

Die Spaltung der Polypeptidkette mit Bromcyan nach Gross und Witkop (20,21) wurde am Hämoglobin durchgeführt. 55 mg (3,2 µ.Mol) CTT-IV werden in 10 ml 70% iger Ameisensäure suspendiert und mit 30 fachem molarem Überschuß (bezogen auf den Methioningehalt) an Bromcyan (288 µ Mol) versetzt. Die Reaktionslösung wird mit Stickstoff durchperlt und im geschlossenen Kolben bei Raumtemperatur 24 Stunden im Dunkeln langsam gerührt.

Nach beendeter Reaktion wird die Lösung auf das 10-fache Volumen verdünnt. Anschließend werden die flüchtigen Nebenprodukte durch Lyophilisation abgetrennt.

3.2. Blockierung der Lysinreste

3.2.1. Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid

77 mg (4,3 µ Mol) CTT-IV werden in 1,5 ml 10 M Harnstoff und 0,5 ml 0,1 M Natriumpyrophosphatlösung gelöst und bei Raumtemperatur portionsweise mit 800 µ 1 1 M Maleinsäureanhydrid in Dioxan (entsprechend einem 20 fachen M Überschuß) versetzt. Der optimale pH-Wert liegt bei pH 9,0 und wird durch Titration mit 1 n Natronlauge im Autotitrator (Radiometer) konstant gehalten.

Wenn keine weitere Lauge verbraucht wird, läßt man die Lösung noch 30 min stehen und entsalzt das Protein über Sephadex G-25 (0,5 oder 1% iges Ammoniumbicarbonat als Elutionsmittel).

3.2.2. Umsetzung mit 5-(Isothiocyanato)benzol-1,3-disulfonsäure Dinatriumsalz (Substanz II)

Die Umsetzung wird entweder in 3-Dimethylamino-I-propin oder Quadrolpuffer unter Zusatz von Triäthylamin durchgeführt.

a) 58 mg CTT-IV (3,5 µ Mol) werden mit 68 mg Substanz II (0,2 mMol)in 0,6 ml 3-Dimethylamino-I-propin und 0,6 ml destilliertem Wasser suspendiert und bei 50°C incubiert. Nach 15 bzw. 30 Minuten wird mit jeweils 10 µ l Triäthylamin versetzt. Nach beendeter Reaktion wird dialysiert und das Proteinderivat lyophilisiert.

b) 20 mg (1,2 µ Mol) CTT-IV werden in 0,4 ml 0,5 molarem Quadrol unter Zusatz von 20 µ l Triäthylamin mit 40 mg Substanz II, nach 30 Minuten mit weiteren 25 mg zwei Stunden bei 50°C incubiert. Nach etwa 15 min ist die anfangs vorliegende Suspension klar gelöst. Nach beendeter Reaktion wird 20 Stunden dialysiert und das Proteinderivat anschließend lyophilisiert. Bei der Dialyse tritt nach einigen Stunden eine Trübung auf.

Vor der tryptischen Spaltung wird von dem geringen in 0,5% iger Ammoniumbicarbonatlösung unlöslichen Anteil abzentrifugiert.

4. Reinigung der Peptide

4.1. Allgemeines

Die Reinigung der Peptide erfolgt durch Gelfiltration über Sephadex (Pharmacia) und Chromatographie an Austauschern. Die Säulen werden entsprechend den Vorschriften für Sephadex und die verwendeten Kationen- und Anionenaustauscher

(s. Kap. 4.3.) gefüllt und äquilibriert. Die Gelfiltrationen werden bei Raumtemperatur durchgeführt, während die Säulen für die Austauscherchromatographie auf 40°C temperiert werden.

Die Extinktionen der einzelnen Fraktionen werden je nach Trennproblem und Elutionspuffer bei 280 nm mit einem Photometer bzw. Uvicord gemessen und/oder ein Aliquot der Fraktionen mit der Ninhydrinreaktion nach alkalischer Hydrolyse ausgewertet. Im Technikon-Autoanalyzer wird die alkalische Hydrolyse, Ninhydrinreaktion und Messung der Extinktionen eines Aliquots der Fraktionen automatisch durchgeführt. Meistens war ein Aliquot von 50-100 µl geeignet.

4.2. Gelfiltration über Sephadex

Bei der Vortrennung des "löslichen" Anteils werden 27 µ Mol auf eine 2,5 x 190 cm lange Sephadex G-50 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt mit 6 M Essigsäure, die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 10 ml/h.

Die Gelfiltration des gesamten Hydrolysates einschließlich der "Core"-Peptide über Sephadex G-75 wird in 3 M Propionsäure bzw. 8 M Harnstofflösung durchgeführt, der 1% Propionsäure und 0,1% Thiodiglykol zugesetzt sind. Das Eluat wird kontinuierlich bei 280 nm gemessen. Bei Verwendung von Harnstoff werden die Fraktionen, die im UV absorbieren ("Core"-Peptide), über Sephadex G-25 entsalzt und lyophilisiert. Die Säule hat die Maße: 1,5 x 180 cm. Es werden zwischen 3 und 3,5 µ Mol aufgetragen.

Für die Trennungen der nach "Argininspaltung" erhaltenen Peptide (nach Blockierung mit Maleinsäureanhydrid bzw. Substanz II(s. Abb. 17))werden 0,5% NH_4HCO_3, 5% Pyridin, 1 M Essigsäure und 1 M Propionsäure als Elutionsmittel verwendet. Die Säulen, die mit Sephadex G-50, G-25 oder G-100 gefüllt sind, haben unterschiedliche Maße; sie sind aus den entsprechenden Legenden ersichtlich.

4.3. Austauscherchromatographie

4.3.1. Chromatographie über Kationenaustauscher

Für die Rechromatographien der über Sephadex vorgetrennten Fraktionen des tryptischen Hydrolysates wurden Phosphor-Cellulose, Dowex 50X2, 200-400 mesh,und SP-Sephadex C-25 eingesetzt. Dowex 50X2 wurde in der Na^+-Form in Äquilibrierpuffer aufgeschlemmt. Bei Verwendung von Phosphor-Cellulose und Dowex waren die Säulen 0,9 cm weit und zwischen 12 und 30 cm lang.

Zur Elution wurden über Mischgefäße mit 100-200 ml Inhalt folgende Pyridin-Formiat-Puffer angeschlossen:

Äquilibrierpuffer:	0,1 n Pyridin-Formiat pH 3,0
1. Gradient:	0,5 n Pyridin-Formiat pH 3,2, ab Fr. 40
2. Gradient:	1,0 n Pyridin-Formiat pH 3,4, ab Fr. 80
3. Gradient:	1,5 n Pyridin-Formiat pH 3,7, ab Fr.120
4. Gradient:	2,5 n Pyridin-Formiat pH 4,4, ab Fr.160

Die Substanz wird bei pH 2,6 in einem Volumen zwischen 6 und 14 ml aufgetragen. Es werden im allgemeinen 3 ml-Fraktionen in 20 min gesammelt (am Peptidator der Fa. Beckman wird ein Durchfluß von 40 ml/Stunde gemessen).

Für die Chromatographie an SP-Sephadex C-25 (Pharmacia, Uppsala) wird eine 0,9 x 38-40 cm lange Säule verwendet, die mit 0,1 M Pyridin-Formiat pH 3,0 äquilibriert und auf 40°C temperiert ist. Das Hydrolysat wird in 0,05 M Pyridin-Formiat pH 2,6 aufgetragen. Fünf Fraktionen werden mit dem Äquilibrierpuffer eluiert, dann wird ein linearer Gradient zwischen 0,1 M Pyridin-Formiat pH 3,0 und 2,0 M Pyridin-Formiat pH 4,4, bei einigen Chromatographien pH 6,1, angeschlossen. Das Volumen der Puffergefäße variiert zwischen 100 und 200 ml. Zur Unterbrechung des Gradienten wird die Säule direkt mit dem stärkeren Puffer oder wie angegeben eluiert.

Von einem Aliquot der Fraktionen wird im Technikon-Autoanalyzer die Ninhydrin-Reaktion durchgeführt.

4.3.2. Chromatographie über Anionenaustauscher

Einige Rechromatographien der Fraktionen des ersten Sephadexlaufes (Elutionsmittel Essigsäure) wurden an Dowex 1x2, 200-400 mesh, und QAE-Sephadex A25 durchgeführt.

Die auf 40°C temperierten Säulen, 0,9 x 12-25 cm lang, waren mit Mischgefäßen von 100-200 ml Inhalt verbunden. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug bei Verwendung des Präparativzusatzes zum Aminosäureanalysator der Fa. Beckman 40-60 ml/Stunde. An die Mischgefäße wurden folgende entlüftete Puffer angelegt:

Äquilibrierpuffer: 0,1 M pH 8,8
0,6 ml Eisessig, 40 ml Pyridin, 40 ml
α -Picolin, 150 ml N-Äthylmorpholin/l

1. Gradient:	0,1 M pH 7,2 6 ml Eisessig, 20 ml Pyridin, 20 ml α -Picolin, 12 ml N-Äthylmorpholin/l
2. Gradient:	0,5 M pH 5,8 30 ml Eisessig, 40 ml α -Picolin, 40 ml Pyridin/l; 5 h
3. Gradient:	5,0 M pH 4.1 300 ml Eisessig, 100 ml Pyridin/l; 3 h

5. Sequenzermittlung

5.1. Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid (17)

Für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure eines Proteins oder Peptids mit der Dansylmethode sind 0,005 μ Mol ausreichend. Liegt das Peptid in Lösung vor, so wird ein entsprechendes Aliquot entnommen, im Exsikkator bei 60°C getrocknet und der Rückstand in 10μl Natriumcarbonatlösung (0,2 M Natriumbicarbonat- und 0,2 M Natriumcarbonatlösung im Verhältnis 1:1) wieder gelöst. Danach wird noch einmal getrocknet, mit 10 μ l H_2O und 10 μ l Dansylchloridlösung in Aceton (2,5 mg/ml) versetzt und eine Stunde bei 40°C incubiert.

Nach beendeter Reaktion (Lösung ist noch schwach gelb gefärbt) wird bei 60°C im Exsikkator getrocknet. Der Rückstand wird mit 50 μ l 6 n HCl aufgenommen und das Reagenzglas im schwachen Vakuum abgeschmolzen. Man hydrolysiert meist 6-7 Stunden. Liegen die Sequenzen Ile-Ile, Ile-Val oder Val-Val am N-Terminus vor, so ist eine längere Hydrolysezeit angebracht. Nach der Hydrolyse wird die Salzsäure durch Trocknung bei 60°C entfernt und der Rückstand in 10 μ l 50% igem Pyridin aufgenommen.

Die Identifizierung der dansylierten Aminosäuren erfolgt durch zweidimensionale Chromatographie auf beidseitig beschichteten Polyamid-Dünnschichtplatten (Fa. Schleicher und Schüll).

Folgende drei Systeme werden verwendet:

System I: 0,5% ige Ameisensäure
System II: Benzol:Eisessig=9:1
System III: 200 ml Essigsäureäthylester, 10 ml Methanol, 10 ml Eisessig.

In den Systemen II und III wird in der gleichen, zu der Chromatographie in System I senkrechten Richtung chromatographiert. Auf einer Seite der Platte wird ein Referenzgemisch oder eine Einzelreferenz von Dansylaminosäuren getüpfelt, auf der anderen Seite die zu identifizierende Probe.

5.2. Automatische Sequenzbestimmung

Die Sequenzanalyse von CTT-IV wurde sowohl am Protein als auch an den Peptiden nur automatisch mit dem Sequenator nach Edman und Begg (10) Fa. Beckman Instruments, Palo Alto, Calif.,ausgeführt.

Die Lysyl-Peptide werden vor ihrem Abbau im Sequenator mit hydrophilen Senfölen des Benzols und Naphtalins (I, II,III und IV, s. Abb. 17) (23,24) umgesetzt. Bei kleinen Peptiden (bis zu 10 Aminosäuren) wird die Methode A, sonst B angewendet. Bei älteren Peptiden empfiehlt sich unabhängig von der Größe ebenfalls Methode B, bei der gegenüber A noch eine Chromatographie über Sephadex als Reinigungsschritt eingeführt ist.

Methode A: 0,5 - 1 μ Mol eines Peptides werden in 40 μ l 3-Dimethylamino-I-propin + 70 μ l Wasser gelöst und mit 2-3 mg I, II, III oder IV versetzt. Das Gemisch wird 60 Minuten bei 50°C incubiert. Die Lösung wird auf 0,4 ml mit 50% igem Äthanol verdünnt und direkt in den Becher des Sequenators eingebracht. Nach programmierter Trocknung wird der Abbau mit Programmpunkt I (Anlagerung) begonnen.

Methode B: 0,5 - 1 μ Mol eines Peptides werden in 100 μ l 0,25 M Quadrol gelöst und mit 20 mg I, II, III oder IV bei 50°C unter Stickstoff umgesetzt. Nach 15 und 30 Minuten werden jeweils 5 μ l Triäthylamin hinzugegeben. Die Reaktion wird nach 60 Minuten unterbrochen und das Peptid sofort über eine Sephadexsäule (Sephadex G-10 oder G-15, Säulenmaß:30x0,9 oder 45x0,9 cm) gereinigt.

Als Puffer dient eine 0,2% ige Natriumbicarbonatlösung, der zur Stabilisierung des Thioharnstoffderivates der Peptide 0,4% Diäthylthioharnstoff hinzugegeben wird. Die Fraktionen (1 ml) werden im UV mit einer 0,2 mm Küvette gemessen. Die Weiterverarbeitung des abgetrennten und zu sequenzierenden Peptides geschieht durch Einengen der entsprechenden Fraktionen im Rotationsverdampfer oder durch Lyophilisation des Peptidderivates und Aufbewahrung unter Stickstoff. Das Lyophilisat wird vor Gebrauch in Wasser/Äthanol = 1:1 (v/v) gelöst und im Becher des Sequenators programmiert getrocknet.

Zusammenfassung

Zur Aufklärung der Primärstruktur des Insektenhämoglobins CTT-IV mit Hilfe der automatischen Sequenzanalyse wurden die nach Spaltung mit Bromcyan und Trypsin erhaltenen Fragmente isoliert. Des weiteren werden die Versuche zur Gewinnung des C-terminalen "Arginylpeptides" nach Umsetzung der Lysinreste mit zwei verschiedenen Blockierungsmitteln beschrieben.

Die Sequenz konnte bis auf die beiden Bereiche Pos. 77-90 und 121-134 bestimmt werden. Zwischen CTT-III und CTT-IV treten unter Berücksichtigung der nicht analysierten Teilbereiche 19-20 Austausche auf. Dieser Unterschied entspricht einer phylogenetischen Distanz wie sie bei den β -Ketten vom Pferd gegenüber denen des Menschen gefunden wird.

Bei CTT-IV wird das invariante distale Histidin in E7 gefunden, während für CTT-III nach Sequenz- und Röntgenstrukturanalyse ein zu Vertebraten-Hämoglobinen unterschiedlicher Hämkomplex vorliegt.

Da bei CTT-IV gegenüber Myoglobin die gleichen Deletionen wie bei CTT-III vorhanden sind, werden die Tertiärstrukturen beider Insektenhämoglobine nur geringfügige Unterschiede zur Tertiärstruktur des Myoglobins aufweisen. Die relativ größten Unterschiede zwischen CTT-III und CTT-IV wurden im N-terminalen Bereich der E-Helix gefunden; kleine Unterschiede zwischen den Tertiärstrukturen dieser Hämoglobine sind daher möglich.

Der etwa doppelt so große Bohreffekt von CTT-IV gegenüber CTT-III wird vermutlich durch die veränderte E-Helix hervorgerufen, die auch für einen unterschiedlichen molekularen Mechanismus des Bohreffektes bei CTT-IV verantwortlich sein dürfte.

Literatur

(1) C.B. Anfinsen, Nobel-Lect. en 1972, p. 100 (1972)
D.F. Steiner, Trans N.Y., Acad.Sc. Ser. 2 30,60 (1967)

(2) G. Buse, S. Braig, u. G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1686 (1969)

(3) R. Huber, O. Epp, u. H. Formanek, Naturwissenschaften, 56, 362 (1969)
R. Huber, O. Epp u. H. Formanek, J. Mol. Biol. 42, 591 (1969)

(4) P.E. Thompson u. D.S. English, Science (Wash.) 152, 75 (1966)

(5) V. Braun, R.R. Crichton u. G. Braunitzer, Z. Physiol. Chem. 349, 197 (1968)

(6) U. Plagens, Dissert. Univ. München 1971

(7) C.L. Prosser u. F.A. Brown, Comparative Animal Physiology, W.R. Saunders, Comp., Philadelphia, London 1962, S. 198 ff.

(8) J. Behlke u. W. Scheler, Acta biol. med. germ. 21, 739 (1968)

(9) T. Svedberg u. J.B. Erikson Quensel, J. Am. Chem. Soc. 56, 1700 (1934)

(10) P. Edman u. G. Begg, Europ. J. Biochem. I, 80 (1967)

(11) K. Titani, M.A. Hermodson, L.H. Ericsson, K.A. Walsh u. H. Neurath Nat.New Biol. 238, 35 (1972)

(12) M.A. Hermodson, L.H. Ericsson, H. Neurath u. K.A. Walsh, Biochemistry Vol. 12, No. 17, 3146 (1973)

(13) T.F. Spande, B. Witkop, Y. Degani u. A. Patschornik Adv. Prot. Chem. Acad. Press N.Y., London (1970)

(14) H. Maurer, Disk-Elektrophorese, W. de Gryter & Co (1969)

(15) P. Edman u. J.Sjögquist, Acta Chem. Scand. 10, 1507 (1956)

(16) J.R. Shelton u. A.W. Schroeder, J.Am. Chem. Soc. 82, 3342 (1960)

(17) W.R. Gray u. B.S. Hartley, Biochem. J. 89, 379 (1963)
W.R. Gray, Methods in Enzymology Bd. XI, 469 (1967)
K.R. Wood u. K. Wang, Biochim. Biophys. Acta 133, 369 (1967)

(18) T.-Y. Liu, zitiert in S. Moore,Chemistry and Biology of Peptides, pp. 629-653 (1972)
J. Meienhofer, Ed.Ann Arbor Publishers Michigan

(19) H. Matsubara u. R.M. Sasaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 175 (1969)

(20) E. Gross u. B. Witkop, J. Biol. Chem. 237, 1856 (1962)

(21) E. Gross, in "Methods in Enzymology" (C.H.W. Hirs, ed.), Vol. II, S. 238. Academic Press,N.Y., 1967

(22) V.M. Ingram, Biochim. Biophys. Acta 28, 593 (1958)

(23) G. Braunitzer, B. Schrank u. A. Ruhfus, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1589 (1970)

(24) G. Braunitzer, B. Schrank u. A. Ruhfus, S. Petersen u. U. Pętersen Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1730 (1971)

(25) A. Rossi-Fanelli, Arch. Biochem. Biophys. 58, 498 (1955)

(26) V. Kostka, F. Carpenter, J. Biol. Chem. 239, 1799 (1964)

(27) P.F. Davison, Science 161, 906 (1968)

(28) C. Tanford, K. Kawahara u. S. Lapanje, J. Amer. Chem. Soc. 89, 729 (1967)

(29) P.J.G. Butler, J.I. Harris, B.S. Hartley u. R.Leberman, Biochem. J. 112, 679 (1969)

(30) L. King u. R.N. Perham, Biochemistry 10, 981 (1971)

(31) S. Braig, Dissertation Universität München, 1970

(32) R. Huber, O. Epp, W. Steigemann u. H. Formanek, Eur. J. Biochem. 19, 42 (1971)

(33) M.F. Perutz, H. Muirhead, J.M. Cox u. L.C.G. Goaman, Nature (London), 219, 131 (1968)

(34) M.F. Perutz, J.C. Kendrew u. H.C. Watson, J. Mol. Biol. 13, 669 (1965)

(35) M.F. Perutz, J. Mol. Biol. 13, 646 (1965)

(36) K. Gersonde, H. Sick, A. Wollmer u. G. Buse, Eur. J. Biochem. 25, 181 (1972)

(37) M.F. Perutz, Nature (London), 228, 726 (1970)

(38) J.C. Kendrew, H.E. Watson, B.B. Strandberg, R.E. Dickerson u. D.C. Phillips, V.C. Shove, Nature 190, 660 (1961)

(39) G. Braunitzer u. V. Braun, Hoppe-Selyer's Z. Physiol. Chem. 340, 88 (1965)
346, 303 (1966)

(40) D.H. Spackman, W.H. Stein u. S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

(41) G. Braunitzer, R. Chen, B. Schrank, u. A. Stangl, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 867-878 (1973)

(42) B. Liebold u. G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol-Chem. 314, 271 (1959)

(43) G. Buse, persönl. Mitteilung

(44) T. Kleinschmidt, persönl. Mitteilung

Lebenslauf

Am 25.1.1943 wurde ich als Tochter des Dipl.Ing. Viktor Mussnig und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Ludewig, in Göttingen geboren. Von 1949-1953 besuchte ich in Minden die Grundschule. Nach neun weiteren Schuljahren am Neusprachlichen Mädchengymnasium Minden legte ich 1962 die Reifeprüfung ab. Es schloß sich ein zweijähriges pharmazeutisches Praktikum in Bad Oeynhausen an. Im Sommersemester 1964 begann ich in München mit dem Chemiestudium. Im Dezember 1966 legte ich das Diplomchemikervorexamen ab, im Juli 1969 das Hauptexamen.

Im September 1969 begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Braunitzer am Max-Planck-Institut für Biochemie in München mit der Anfertigung der Diplom- und Doktorarbeit.

Im März 1971 heiratete ich Dr. Ulrich Plagens, unsere Tochter Kirsten wurde im April des folgenden Jahres geboren. Von Januar bis Oktober 1972 wurde die Arbeit am Max-Planck-Institut unterbrochen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1973 experimentell beendet.